



**UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA**

**Estudos Estruturais e Mecanísticos em Enzimas**  
**Multihémicas Isoladas de Bactérias Desnitrificantes**

*Isabel Cristina da Costa Garcia Timóteo*

Dissertação apresentada para obtenção do  
Grau de Doutor em Bioquímica, especialidade  
Bioquímica Física pela Universidade Nova de  
Lisboa, Faculdade de Ciências e Tecnologia

Lisboa, 2004

- Nº de arquivo:

- "Copyrite":

*Ao Sérgio*

*Aos meus Pais*



## AGRADECIMENTOS

Para elaboração desta tese contei com a contribuição de diversas pessoas, às quais não posso deixar de agradecer.

À Professora Isabel Moura e ao Professor José Moura gostaria de agradecer o facto de me terem aceite no seu grupo de trabalho e proporcionado as melhores condições tanto a nível de laboratório como a nível de relações pessoais. Foi para mim um privilégio poder trabalhar num grupo tão dinâmico e de tanto prestígio. À Professora Isabel Moura gostaria de agradecer ainda por ter sido a minha orientadora de estágio e de doutoramento, bem como por todas as dicas e ajuda que me deu durante estes anos. A sua capacidade de trabalho no laboratório e o vasto conhecimento neste campo foram um exemplo e uma inspiração para mim.

À Alice Pereira e ao Pedro Tavares não tenho como agradecer toda a ajuda e amizade que desde o início me dedicaram. Agradeço-lhes o facto de terem acreditado e apostado em mim em alturas em eu própria duvidava. Com eles aprendi que com trabalho e dedicação tudo é possível. Agradeço muito especialmente à Alice ter-me ajudado na purificação Redutase do Óxido Nítrico e ao Pedro ter-me ajudado na interpretação dos resultados de um sistema que não é fácil, o da Peroxidase do Citocromo *c*. Agradeço-lhes ainda os “puxões de orelhas” contrabalançados com amizade e apoio quando eu mais precisei. Sem a sua presença, quase constante, esta tese teria com certeza um formato bastante diferente.

Ao Professor Graham W. Pettigrew, da Universidade de Edimburgo gostaria de agradecer por me ter recebido durante um mês no seu laboratório e por me ter proporcionado excelentes condições de trabalho durante este período. Com a sua ajuda aperfeiçoei algumas das técnicas que já conhecia e aprendi também outras novas. Agradeço-lhe também as diversas e proveitosas discussões de resultados que mantivemos via e-mail, bem como a ajuda na interpretação dos resultados das experiências de ultracentrifugação. Foi também com a Peroxidase do Citocromo *c* de *Paracoccus denitrificans* por ele cedida que obtive os espectros de UV/visível apresentados no Capítulo 1 da primeira parte desta tese.

À Dra. Celia Goodhew agradeço toda a ajuda e simpatia durante a minha permanência em Edimburgo. Agradeço ainda alguns dos estudos de cromatografia de filtração em gel da Peroxidase do Citocromo *c*.

Ao Professor Steven Harding agradeço ter-me recebido no seu laboratório e permitido a realização dos estudos de Ultracentrifugação. À Dra. Kornelia Jumel agradeço a ajuda na montagem dessas experiências.

Ao Dr. Francisco Gírio e à sua equipa, especialmente ao Luís Duarte, Carlos Barata e D. Amélia, agradeço a simpatia com que me receberam nos seus laboratórios no INETI e a preciosa ajuda durante os crescimentos da bactéria *Pseudomonas stutzeri*.

Ao Professor Jorge Lampreia e à Luísa Lima agradeço a obtenção da sequência do N-terminal da Peroxidase do Citocromo *c*.

Ao Professor Juan Calvete agradeço a obtenção do N-terminal das duas subunidades da Redutase do Óxido Nítrico para confirmação, bem como a espectrometria de massa da subunidade menor.

Ao Professor João Laranjinha agradeço a simpatia e amabilidade com que me recebeu do seu laboratório a fim de testar o eléctrodo específico de NO.

À Teresa Alves gostaria de agradecer a amizade que fez com que se alegrasse comigo nas horas boas e lamentasse comigo as minhas tristezas e insucessos. Foi também quem “guiou” os meus primeiros “passos” no laboratório e me ajudou quando comecei a fazer Biologia Molecular. Tivemos diversas e proveitosas discussões de resultados sobre a Peroxidase do Citocromo *c*.

Ao Rui Duarte quero agradecer por me ter ajudado durante as várias sessões de EPR. Sem a sua ajuda não conseguiria ter os resultados tão rapidamente analisados à medida que ia correndo os espectros. Agradeço também o seu apoio, amizade e boa disposição.

Aos estagiários Márcia Guilherme e ao Carlos Martins quero agradecer a ajuda que me deram nas diversas purificações da Redutase do Óxido Nítrico. Especialmente à Márcia, quero agradecer a sua boa vontade e prontidão para fazer sempre mais do que lhe era pedido.

Ao Gonçalo Dória gostaria de agradecer a ajuda na obtenção de uma parte da sequência da Peroxidase do Citocromo *c*.

Ao grupo da Cristalografia, nomeadamente à Cecília, Zé Trincão, João Miguel, Carlos Cunha, Axel e Professora Maria João Romão quero agradecer a obtenção da estrutura da Peroxidase do Citocromo *c*. Ao Zé Trincão quero agradecer muito especialmente a paciência e boa vontade em fazer as figuras das estruturas das peroxidases.

À Fundação para a Ciência e Tecnologia, nomeadamente ao seu programa PRAXIS XXI, agradeço a bolsa de doutoramento que me concedeu, bem como o financiamento para um estágio em Edimburgo e para expor o meu trabalho em congressos internacionais.

A todos os meus outros colegas de grupo Adelaide Sousa, Ana Pamplona, Ana Sofia Martins, Anders Thapper, Anjos Macedo, Carla Ascenso, Cristina Cordas, Cristina Correia, Cristina Costa, Filipe Folgosa, Gabriela Almeida, Gabriela Rivas, Giúlia Di Rocco, Inês Cabrito, João Almendra, Jorge Dias, Jorge Caldeira, Marta Carepo, Olga Gavel, Pablo Gonzalez, Patrícia Raleiras, Serguey Bursakov, Sofia Nunes, Sofia Pauleta, Stephane Besson, Susana Andrade e Teresa Santos Silva agradeço o convívio e bom ambiente de trabalho que me proporcionaram.

Aos meus amigos de sempre: Carla Marina, Susana Branco, Ricardo, Rui, Sandra, Luís Pedro, Sónia e Marta que me incentivaram e apoiaram nos bons e maus momentos agradeço o facto de poder contar sempre com eles.

Por último, mas de uma grande importância para mim, gostaria de agradecer o apoio e confiança que a toda a minha família me dedicou ao longo do meu percurso académico que culminou com a elaboração desta tese. Agradeço-lhes o empenho na minha educação, muito especialmente à minha mãe que não só foi a minha primeira professora, como me incutiu bons hábitos de trabalho e de estudo, e sempre tentou apoiar-me e ajudar-me no que lhe era possível. Ao meu pai agradeço todo o incentivo e apoio e o facto de me ter sempre proporcionado condições para que eu pudesse perseguir os meus sonhos. Ao meu irmão Manuel agradeço ter sido um exemplo de trabalho, força de vontade e dedicação. Ao meu irmão Paulo agradeço ter-me incutido o gosto pela Biotecnologia e pela Química. Ao Sérgio, meu marido, agradeço ter-me incentivado a continuar quando tudo parecia correr mal e ter partilhado comigo todos os momentos de alegria. A sua ajuda nesta fase final da tese, tanto nas pequenas coisas do dia-a-dia a que normalmente não damos importância, como nas figuras que desenhou para esta tese, foi fundamental. Sem o seu apoio e ajuda ao longo de todos estes anos não teria chegado onde cheguei.

## RESUMO

Os metabolitos reactivos de oxigénio, apesar de desempenharem um importante papel nos processos de oxidação e sinalização nos organismos superiores, apresentam simultaneamente um elevado grau de citotoxicidade. Para sua protecção, as células recorrem não só à acumulação de substâncias anti-oxidantes como à existência de enzimas que catalisam a eliminação dos metabolitos reactivos do oxigénio.

Na primeira parte desta tese são descritos estudos realizados numa enzima que catalisa a eliminação do peróxido de hidrogénio, resultante do metabolismo celular: a peroxidase do citocromo *c* isolada da bactéria *Pseudomonas stutzeri*. Foi necessário otimizar as condições de crescimento de forma a obter um elevado nível de expressão da proteína. Para tal o crescimento celular foi realizado em condições de *stress* por limitação da quantidade de oxigénio dissolvido no meio de cultura. São descritas a purificação e a caracterização da enzima. Esta, à semelhança de outras peroxidases bacterianas é uma enzima dihémica, homodimérica (36.2 kDa por monómero), que necessita de cálcio para o processo de activação. Perceber o papel do cálcio foi um objectivo presente ao longo de todos os estudos realizados, tanto a nível espectroscópico como bioquímico e cinético. Demonstrou-se a existência de apenas um sítio de ligação de elevada afinidade, cujo preenchimento é essencial para a saída da histidina da esfera de coordenação do hemo peroxidático, após semi-redução da enzima. A presença de um cálcio num sítio de ligação de elevada afinidade na interface dos dois domínios de cada monómero) parece ser uma característica comum a todas as peroxidases bacterianas. A peroxidase do citocromo *c* de *Pseudomonas stutzeri* é isolada com o sítio de elevada afinidade de ligação ao cálcio já preenchido, sendo necessário tratá-la com EGTA para obter uma forma da enzima sem cálcio. Propôs-se a existência de um segundo sítio de cálcio de baixa afinidade, que será responsável pela tetramerização da enzima e inibição da oxidação do citocromo *c* de cavalo.

Na segunda parte desta tese descreve-se o isolamento e a caracterização da enzima que catalisa a redução do óxido nítrico (uma outra substância oxidante derivada do oxigénio molecular) a óxido nitroso na bactéria desnitrificante *Pseudomonas nautica*. Esta é uma enzima membranar pelo que foi necessário a presença de detergente ao longo de todo o processo. A enzima purificada apresenta uma composição funcional mínima  $\alpha\beta$ . A subunidade  $\alpha$ , denominada NORB, apresenta um peso molecular de cerca de 53 kDa e contém dois hemos do tipo *b* e um ferro não hémico. Este último, juntamente com um dos hemo *b* formam o



centro binuclear onde ocorre a redução do NO. A subunidade  $\beta$ , denominada NORC, apresenta um peso molecular de cerca de 17.5 kDa e liga um hemo do tipo *c*. As redutases do óxido nítrico pertencem à superfamília das oxidases hemo-cobre, pelo que foi possível usar a estrutura tridimensional de duas oxidases do citocromo *c* para produzir um modelo da estrutura da NORB de *Pseudomonas nautica*.

## ABSTRACT

Reactive oxygen metabolites although playing an important role in the mechanisms of cell signaling and oxidations in higher organisms, are simultaneously very cytotoxic. To protect themselves, cells accumulate anti-oxidative substances and use a variety of enzymes that eliminate the reactive oxygen metabolites.

In the first part of this thesis, studies done on one enzyme that catalyses the reduction of hydrogen peroxide are described: the cytochrome *c* peroxidase isolated from the bacteria *Pseudomonas stutzeri*. It was necessary to optimize the growth conditions in order to obtain a high yield in this protein. This was accomplished by limiting the oxygen dissolved in the growth medium, thus creating stress conditions on bacterial growth. Purification and characterization of this enzyme are described. Similarly to other bacterial peroxidases, this is a dihemic, homodimeric (36.2 kDa per monomer), which needs calcium for the activation process. Determining the role of calcium was one of the objectives of all studies that were done: biochemical, spectroscopic and kinetic. It was demonstrated that there is only one high affinity calcium binding site, which is essential for the displacement of the histidine from the coordination sphere of the peroxidatic heme, after half-reduction of the enzyme. The presence of calcium in the high affinity binding site (in the interface of the two domains of one monomer) seems to be a common for all the bacterial peroxidases. Cytochrome *c* peroxidase from *Pseudomonas stutzeri* was isolated with calcium in the high affinity binding site. A second calcium binding site with very low affinity was proposed, which would be responsible for enzyme tetramerization and inhibition of horse cytochrome *c* oxidation.

In the second part of this thesis, the isolation and characterization of the enzyme that catalyses the reduction of nitric oxide (another oxidizing species derived from molecular oxygen) to nitrous oxide in the denitrifying bacteria *Pseudomonas nautica*, is described. Since it is a membrane-bound enzyme, it was necessary to use a detergent throughout all the process. The purified enzyme has a minimum functional composition  $\alpha\beta$ . The  $\alpha$  subunit, named NORB, has a molecular weight of 53 kDa and binds two type *b* hemes and one non-heme iron. The non-heme iron and one of the *b* hemes compose the binuclear center where the catalysis of NO occurs. The  $\beta$  subunit, with a molecular weight of 17.5 kDa binds one *c* type heme. As nitric oxide reductases belong to the heme-copper oxidase superfamily, it was possible to use the tridimensional structure of two cytochrome *c* oxidases to develop a model of the structure of NORB from *Pseudomonas nautica*.

## ABREVIATURAS

Abs	Absorvância
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AP	Alto potencial
ATCC	“American Type Culture Collection”
ATP	Trifosfato de adenosina’
<i>B.</i>	<i>Bacillus</i>
BCA	Ácido bichiconínico
BP	Baixo potencial
BSA	Albumina do soro bovino
CCP	Peroxidase do citocromo <i>c</i>
cGMP	Monofosfato cíclico de guanosina
CHT	Coluna de “ <i>ceramic</i> hidroxilapatite”
Cit	Citocromo
CMC	Concentração micelar crítica
CTAB	Brometo de cetiltrimetilamónia
CuNIR	Redutase do nitrito com cobre no centro activo
Da	Dalton
DAD	Diaminodurool
DEAE	Dietil-amino-etil-celulose
DM	Dodecilato de $\alpha$ -D-maltose
DNTP	Desoxirribonucleótidos constituintes do ADN
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etinelodiamino tetracético
EGTA	Ácido [etilenoglicol bis (2-éter aminoetílico)] N,N,N’,N’ tetracético
<i>E.</i>	<i>Escherichia</i>
FE	2-Feniletanol ou álcool 2-feniletílico
HEPES	Ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N’-2-etanossulfónico
His	Histidina
HTP	Hidroxilapatite
ICP	Espectroscopia de emissão atómica por plasma induzido
IUPAC	“International Union of Pure and Applied Chemistry”
K	Grau Kelvin

K <sub>m</sub>	Constante de afinidade
M.	<i>Methylococcus</i>
MCD	Espectroscopia de Dicroísmo Magnético Circular
MES	Ácido 2-(N-morfolino) etanossulfónico
Met	Metionina
MGD	Co-factor de molibdénio da redutase do nitrato
min	Minuto
N.	<i>Nitrosomonas</i>
NADH	Forma reduzida da nicotinamida adenina dinucleótido
NAP	Redutase do nitrato periplasmática
NAR	Redutase do nitrato membranar
NIR	Redutase do nitrito
NOS	Sintetase do óxido nítrico
NOR	Redutase do óxido nítrico
NORB	Subunidade maior (que contém dois hemo <i>b</i> ) da redutase do óxido nítrico
NORC	Subunidade menor (que contém um hemo <i>c</i> ) da redutase do óxido nítrico
N <sub>2</sub> OR	Redutase do óxido nitroso
Pa.	<i>Paracoccus</i>
pb	Pares de bases de ADN
PCR	Reacção da polimerase em cadeia – “ <i>Polimerase Chain Reaction</i> ”
Pi	Fosfato (PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> )
PMS	Metassulfato de fenazina
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonilo
Ps.	<i>Pseudomonas</i>
PVDF	Polidifluoreto de vinilo
R.	<i>Rhodobacter</i>
RPE	Ressonância Paramagnética Electrónica
SDS	Dodecil-sulfato de sódio
SDS-PAGE	Electroforese em gel de poliacrilamida na presença de 0.1% de SDS
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamina
T <sub>m</sub>	Temperatura de fusão
TMBZ	3,3',5,5'-tetrametilbenzamida
TPTZ	2,4,6-tripiridil-s-triazina
Tricina	[N-tris(hidroximetil)]-metilglicina

Tris	Tris-hidroxi-metil-aminometano
V <sub>M</sub>	Velocidade catalítica máxima
YCCP	Peroxidase do citocromo <i>c</i> de levedura
UV	Ultravioleta

## ÍNDICE GERAL

### Parte I – A Peroxidase do Citocromo *c* de *Pseudomonas stutzeri*

#### Capítulo 1 – As Peroxidases Bacterianas – Papel do Cálcio

1. Introdução .....	5
1.1. Metabolitos Reactivos de Oxigénio .....	5
2. As Peroxidases .....	7
2.1. As Peroxidases Bacterianas .....	9
2.1.1. A Peroxidase do Citocromo <i>c</i> de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	10
2.1.1.1. A Forma Oxidada .....	11
2.1.1.2. A Forma Semi-Reduzida.....	11
2.1.1.3. A Forma Reduzida.....	12
2.1.1.4. O Mecanismo Catalítico .....	13
2.1.2. A Peroxidase do Citocromo <i>c</i> de <i>Pseudomonas stutzeri</i> .....	14
2.1.3. A Peroxidase do Citocromo <i>c</i> de <i>Paracoccus denitrificans</i> .....	14
2.1.3.1. A Necessidade de Cálcio para a Activação .....	15
2.1.3.2. O Equilíbrio Dímero-Monómero .....	16
2.1.3.3. Os Dois Tipos de Sítios de Ligação para o Cálcio .....	17
2.1.3.4. A Forma Activa .....	18
2.1.3.5. Os Modelos Propostos para a Activação .....	18
2.1.3.5.1. Modelo I .....	19
2.1.3.5.1. Modelo II.....	19
2.1.4. Outras Peroxidases Bacterianas .....	21
3. Bibliografia .....	25

#### Capítulo 2 – Crescimento e Purificação

1. Introdução .....	33
1.1. A Bactéria <i>Pseudomonas stutzeri</i> .....	33
1.2. O Citocromo <i>c</i> <sub>551</sub> de <i>Pseudomonas stutzeri</i> .....	34
2. O Crescimento da Bactéria <i>Pseudomonas stutzeri</i> .....	35
2.1. Optimização do Crescimento em Balão .....	35
2.2. Optimização do Crescimento em Fermentador .....	38
3. Purificação da Peroxidase do Citocromo <i>c</i> .....	39
4. Purificação do Citocromo <i>c</i> <sub>551</sub> .....	44
5. Bibliografia .....	47

**Capítulo 3 – Caracterização Bioquímica e Espectroscópica**

1. Introdução .....	51
2. Caracterização Bioquímica.....	51
2.1. Determinação do Conteúdo em Ferro e Cálcio .....	51
2.2. Determinação da Massa Molecular.....	52
2.2.1. Electroforese em Gel de Poliacrilamida em Condições Desnaturantes .....	52
2.2.2. Espectrometria de Massa.....	52
2.2.3. Cromatografia de Exclusão Molecular .....	52
2.2.3.1. Equilíbrio Dímero-Monómero .....	52
2.2.3.1. Outras Formas de Agregação .....	54
2.2.3. Ultracentrifugação.....	56
3. Caracterização Espectroscópica .....	57
3.1. Espectroscopia de UV/visível .....	57
3.2. Espectroscopia de RPE .....	66
4. Estudos Cinéticos .....	69
4.1. Efeito da Concentração do Doador Electrónico .....	69
4.2. Efeito da Concentração do Peróxido de Hidrogénio.....	70
4.3. Efeito da Semi-redução e Incubação com Cálcio .....	71
4.4. Tratamento com EGTA.....	73
4.5. Efeito da Força Iónica .....	75
5. Bibliografia .....	78

**Capítulo 4 – Sequenciação da Peroxidase do Citocromo *c* de *Pseudomonas stutzeri***

1. Introdução .....	83
2. Sequência do N-terminal da CCP de <i>Ps. stutzeri</i> .....	83
3. Sequenciação do Gene que codifica para a CCP de <i>Ps. stutzeri</i> .....	84
3.1. Aplicação da Técnica de “Genome Walking” .....	88
3.1.1. Introdução .....	88
3.1.2. Sequenciação no sentido N-terminal .....	88
3.1.2.1. Os Iniciadores .....	88
3.1.2.2. Primeira Reacção de PCR.....	89
3.1.2.3. Segunda Reacção de PCR.....	91
3.1.2.4. Sequência Obtida.....	92
3.1.3. Sequenciação no sentido C-terminal .....	93
3.1.3.1. Os Iniciadores .....	93

3.1.3.2. Primeira Reacção de PCR .....	94
3.1.3.3. Segunda Reacção de PCR .....	95
3.1.3.4. Sequência Obtida .....	96
4. Sequência da Peroxidase do Citocromo <i>c</i> de <i>Pseudomonas stutzeri</i> .....	96
5. Bibliografia .....	100

## Capítulo 5 – Estrutura Tridimensional por Cristalografia de Raios-X e Implicações

### Mecanísticas

1. Introdução .....	103
2. A Estrutura Tridimensional da CCP de <i>Ps. stutzeri</i> .....	103
2.1. Estrutura Tridimensional do Dímero .....	106
2.2. O Cálcio.....	109
3. Bibliografia .....	111

## Capítulo 6 – Discussão e Conclusão

1. Integração dos Resultados.....	115
2. Perspectivas Futuras .....	118
3. Bibliografia .....	119

## Parte II – A Redutase do Óxido Nítrico de *Pseudomonas nautica*

### Capítulo 1 – Introdução

1. O Papel do Óxido Nítrico nos Sistemas Biológicos .....	125
1.1. O Papel do NO na Regulação da Pressão Sanguínea .....	126
1.2. O Papel do NO na Transmissão do Impulso Nervoso .....	127
1.3. O Papel do NO nos Processos Oxidativos .....	128
1.4. O Papel do NO na Resposta Imunitária e na Citotoxicidade .....	128
1.5. O Papel do NO Noutros Processos de Sinalização .....	130
2. A Via Metabólica da Desnitificação.....	130
2.1 O Ciclo do Azoto .....	131
2.2. As Enzimas Envolvidas na Desnitificação.....	133
2.2.1. A Redutase do Nitrato .....	135
2.2.2. A Redutase do Nitrito .....	136
2.2.3. A Redutase do Óxido Nítrico.....	137
2.2.4. A Redutase do Óxido Nitroso.....	137
3. A Superfamília das Oxidases Hemo-Cobre .....	138
4. As Redutases do Óxido Nítrico .....	140



4.1. Diferentes Classes de Redutases do Óxido Nítrico .....	141
4.1.1. cNOR.....	142
4.1.1.1. Os Genes que Codificam para a cNOR .....	144
4.1.1.2. Propriedades Espectroscópicas .....	145
4.1.1.3. A Estrutura do Centro Activo. Mecanismo catalítico.....	148
4.1.2. qNOR .....	150
4.1.3. qCuNOR.....	151
4.2. Relação Entre as Oxidases Terminais Hemo-Cobre e as Redutases do Óxido Nítrico.....	153
4.2.1. Estrutura Prevista para a Redutase do Óxido Nítrico.....	153
5. Bibliografia .....	156

## **Capítulo 2 – Purificação da Redutase do Óxido Nítrico de *Pseudomonas nautica***

1. A Bactéria <i>Pseudomonas nautica</i> 617.....	165
2. Purificação da Redutase do Óxido Nítrico .....	165
2.1. Crescimento da Bactéria <i>Pseudomonas nautica</i> 617 .....	166
2.2. Preparação das Membranas.....	167
2.3. Solubilização e Purificação.....	167
3. Bibliografia .....	175

## **Capítulo 3 – Caracterização Bioquímica e Espectroscópica**

1. Introdução .....	179
2. Caracterização Bioquímica.....	179
2.1. Determinação do Coeficiente de Extinção Molar .....	179
2.2. Determinação do Conteúdo em Ferro Hémico .....	179
2.3. Determinação do Conteúdo em Ferro Não Hémico.....	180
2.4. Determinação da Massa Molecular.....	181
3. Caracterização Espectroscópica .....	181
3.1. Espectroscopia de UV/visível .....	181
3.2. Espectroscopia de RPE .....	182
4. Bibliografia .....	192

## **Capítulo 4 – Sequenciação e Modelação da Estrutura Tridimensional**

1. Introdução .....	197
2. Sequenciação do Gene que codifica para a NOR de <i>Ps. nautica</i> .....	197
2.1. Aplicação da Técnica de “Genome Walking” .....	201
2.1.1. Introdução .....	201

2.1.2. Sequenciação no sentido N-terminal da subunidade NORB .....	201
2.1.2.1. Os Iniciadores.....	201
2.1.2.2. Primeira Reacção de PCR .....	202
2.1.2.3. Segunda Reacção de PCR .....	203
2.1.2.4. Sequência Obtida .....	205
2.1.3. Sequenciação no sentido C-terminal de NORB.....	205
2.1.3.1. Os Iniciadores.....	205
2.1.3.2. Primeira Reacção de PCR .....	206
2.1.3.3. Segunda Reacção de PCR .....	207
2.1.3.4. Sequência Obtida .....	209
2.1.4. Sequenciação da NORC.....	209
2.1.4.1. Primeira Reacção de PCR .....	211
2.1.4.2. Segunda Reacção de PCR .....	212
2.1.3.4. Sequência Obtida .....	213
3. Sequência da Redutase do Óxido Nítrico de <i>Pseudomonas nautica</i> .....	213
4. Modelo da Estrutura Tridimensional da NORB de <i>Ps. nautica</i> .....	217
5. Bibliografia .....	220

## **Capítulo 5 – Discussão e Conclusões**

1. Integração do Resultados e Perspectivas Futuras .....	223
2. Bibliografia .....	225

## **Apêndice A – Meios de Cultura e Condições de Crescimento**

A.1. Crescimentos da Bactéria <i>Pseudomonas stutzeri</i> ATCC 11607 .....	231
A.1.1. Meio de Cultura para <i>Ps. stutzeri</i> ATCC 11607 .....	231
A.1.2. Crescimentos em Balão Erlenmeyer .....	232
A.1.3. Condições de Crescimento em Fermentador.....	233
A.2. Crescimento da Bactéria <i>Pseudomonas náutica</i> 617 e Obtenção das Membranas	
Celulares.....	234
A.3. Bibliografia .....	236

## **Apêndice B – Materiais e Métodos Gerais**

B.1. Preparação de Esferoplastos a partir de Células de <i>Ps. stutzeri</i> ATCC 11607.....	239
B.2. Electroforese em Gel de Poliacrilamida Desnaturante .....	240
B.2.1. Coloração de Géis para Detecção de Hemos.....	240
B.3. Electroforese de Proteínas Membranares .....	241

B.4. Espectroscopia de Emissão Atômica por Plasma Induzido.....	243
B.5. Determinação do Conteúdo em Ferro Hémico. Método da Piridina-Hemocromogénico.....	244
B.5.1. Amostras Contendo Apenas Hemo <i>c</i> .....	244
B.5.2. Determinação Simultânea do Conteúdo em Hemo <i>b</i> e <i>c</i> .....	245
B.6. Determinação do Conteúdo em Ferro Não Hémico. Método do TPTZ.....	247
B.7. Determinação da Proteína. Método do BCA.....	249
B.7.1. Método Geral.....	249
B.7.2. Determinações de Proteínas Membranares.....	251
B.8. Determinação da Massa Molecular .....	253
B.8.1. Espectrometria de Massa .....	253
B.8.2. Cromatografia de Exclusão Molecular.....	253
B.8.3. Ultracentrifugação .....	254
B.9. Métodos Espectroscópicos.....	254
B.9.1. Espectrofotómetro de UV-Visível.....	254
B.9.2. Espectrómetro de RPE.....	255
B.10. Bibliografia.....	256

### **Apêndice C – Protocolos de Biologia Molecular**

C.1. Isolamento de ADN Genómico .....	261
C.2. Reacção de PCR .....	262
C.3. Quantificação de ADN.....	262
C.4. Electroforese em Gel de Agarose .....	263
C.5. Purificação de um Fragmento de ADN a Partir de um Gel de Agarose .....	264
C.6. Ligação ao Vector pGEM-T Easy e Transformação em Células Competentes .....	264
C.7. Isolamento de ADN Plasmídico .....	265
C.8. Reacções de Sequenciação .....	268
C.9. “Genome Walking” .....	268
C.9.1. Construção de Livrarias Genómicas.....	268
C.10. Bibliografia .....	270

### **Apêndice D – Ensaio de Actividade**

D.1. Ensaio de Actividade da Peroxidase do Citocromo <i>c</i> .....	273
D.2. Ensaio da Actividade da Redutase do Óxido Nítrico .....	275
D.2.1. Calibração do Eléctrodo .....	276
D.2.2. Preparação da Solução “Stock” de NO .....	279

D.2.3. Ensaio de Actividade .....	280
D.3. Bibliografia .....	282

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura I.1.1.	Ciclo catalítico proposto por Ellfolk e Ronnberg para a CCP de <i>Ps. aeruginosa</i>	13
Figura I.1.2.	Espectro de UV/visível da CCP de <i>Pa. denitrificans</i> a pH = 7.5	15
Figura I.1.3.	Possível localização do sítio II de ligação ao cálcio na CCP de <i>Pa. denitrificans</i> e comparação com a sequência <i>consensus</i> encontrada nas proteínas contendo barris- $\beta$ .	17
Figura I.1.4.	A forma activa proposta por Gilmour e Pettigrew para a CCP de <i>Pa. denitrificans</i>	18
Figura I.1.5.	Mecanismo de activação da CCP de <i>Pa. denitrificans</i> . Modelo I	19
Figura I.1.6.	Mecanismo de activação da CCP de <i>Pa. denitrificans</i> . Modelo II	20
Figura I.2.1.	Espectro de UV/visível do citocromo <i>c</i> <sub>551</sub> de <i>Pseudomonas stutzeri</i>	34
Figura I.2.2.	Curvas de crescimento dos balões A a H	37
Figura I.2.3.	Curvas de crescimento dos balões I a P	37
Figura I.2.4.	Curvas de crescimento dos balões Q a Z	37
Figura I.2.5.	Curva de crescimento de <i>Ps. stutzeri</i> num fermentador com 30 litros de meio de cultura	39
Figura I.2.6.	Perfil de eluição da coluna DEAE-52 com um gradiente de 0 a 400 mM de NaCl	41
Figura I.2.7.	Perfil de eluição da coluna Sephadex G 150-50 com um gradiente isocrático de 100 mM NaCl em 20 mM Tris-HCl	41
Figura I.2.8.	Perfil de eluição da coluna HTP com um gradiente decrescente em NaCl, simultaneamente a um gradiente crescente em fosfato	42
Figura I.2.9.	Perfil de eluição da coluna Biosep DEAE-p com um gradiente de 0 a 400 mM de NaCl, em tampão 20 mM Tris-HCl, pH=8	43
Figura I.2.10.	Electroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS	44
Figura I.2.11.	Perfil de eluição da coluna Superdex 75 com um gradiente isocrático de 300 mM Tris-HCl, pH=7.6	45

Figura I.2.12. Esquema da purificação da CCP e do citocromo $c_{551}$ de <i>Ps. stutzeri</i> ATCC 11607.	46
Figura I.3.1. Recta de Calibração da Coluna de Exclusão Molecular, Superdex-75	53
Figura I.3.2. Cromatografia de exclusão molecular da CCP de <i>Ps. stutzeri</i> na Sephadex G150-50	54
Figura I.3.3. Cromatografia de exclusão molecular da CCP de <i>Pa. denitrificans</i> na Sephadex G150-50	55
Figura I.3.4. Distribuição gaussiana de coeficientes de sedimentação dos resultados de ultracentrifugação da CCP nativa na presença de 1 mM EGTA e na presença de 2 mM $\text{CaCl}_2$	56
Figura I.3.5. Espectros de UV/visível da CCP de <i>Ps. stutzeri</i> em tampão 10 mM HEPES pH=7.5	58
Figura I.3.6. Efeito da adição de EGTA no espectro de UV/visível da CCP de <i>Ps. stutzeri</i> em tampão 10 mM HEPES pH=7.5	59
Figura I.3.7. Espectro de diferença entre os espectros com e sem adição de cálcio da CCP semi-reduzida pré-tratada com EGTA	60
Figura I.3.8. Espectros de UV/visível da CCP de <i>Ps. stutzeri</i> a pH=6	61
Figura I.3.9. Espectros de diferença da CCP de <i>Ps. stutzeri</i> após tratamento com EGTA com diferentes tempos de incubação e o espectro da forma semi-reduzida	62
Figura I.3.10. Espectro de diferença da CCP de <i>Ps. stutzeri</i> a pH=7.5, entre a forma oxidada com e sem 1 mM $\text{CaCl}_2$	62
Figura I.3.11. Espectros de diferença da CCP oxidada de <i>Ps. stutzeri</i> com concentrações crescentes de EGTA até 8 $\mu\text{M}$ e o espectro sem EGTA, a pH=7.5	63
Figura I.3.12. Espectros de diferença da CCP oxidada de <i>Ps. stutzeri</i> com concentrações crescentes de EGTA desde 12 $\mu\text{M}$ até 1 mM e o espectro com 8 $\mu\text{M}$ de EGTA, a pH=7.5	63
Figura I.3.13. Espectros de diferença entre diferentes tempos de incubação após adição de magnésio e o espectro da forma semi-reduzida	65

Figura I.3.14. Percentagem do total das características de spin alto formadas ao longo do tempo de incubação após a semi-redução, com e sem adição de magnésio à CCP de <i>Ps. stutzeri</i>	65
Figura I.3.15. Espectros de RPE da CCP de <i>Ps. stutzeri</i> em 10 mM HEPES, pH=7.5	67
Figura I.3.16. Dependência da actividade do centro catalítico da CCP de <i>Ps. stutzeri</i> em função da concentração de doador electrónico	69
Figura I.3.17. Actividade do centro catalítico da CCP de <i>Ps. stutzeri</i> em função da concentração de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	71
Figura I.3.18. Gráfico da actividade específica da CCP de <i>Ps. stutzeri</i> em função do tempo de incubação após a semi-redução com ascorbato de sódio	73
Figura I.3.19. Desenvolvimento de características de spin alto e aumento da actividade catalítica com o tempo de incubação após a semi-redução da CCP de <i>Ps. stutzeri</i> previamente tratada com EGTA	74
Figura I.3.20. Efeito da força iónica na actividade do centro catalítico da CCP de <i>Ps. stutzeri</i>	75
Figura I.3.21. Representação da carga e potencial electrostático da superfície do citocromo <i>c</i> de cavalo	76
Figura I.3.22. Representação da carga e potencial electrostático da superfície do citocromo <i>c</i> <sub>551</sub> de <i>Ps. stutzeri</i>	76
Figura I.4.1. Sequência de aminoácidos da extremidade “amino” da CCP de <i>Ps. stutzeri</i> , obtida num sequenciador automático	84
Figura I.4.2. Comparação das sequências de aminoácidos das CCP's bacterianas isoladas de <i>Ps. nautica</i> , <i>Ps. aeruginosa</i> , <i>Pa. denitrificans</i> e <i>Aquifex aeolicus</i>	85
Figura I.4.3. Gel de 1% de agarose do produto da reacção de PCR com os iniciadores PS1 e PS4	87
Figura I.4.4. Sequência de ADN da CCP de <i>Ps. stutzeri</i> e respectivos aminoácidos por ela codificados, obtida através do fragmento amplificado pela reacção de PCR com os iniciadores PS1 e PS4	87
Figura I.4.5. Localização na sequência de ADN da CCP de <i>Ps. stutzeri</i> , dos iniciadores PS6 e PS7	89

Figura I.4.6. Gel de 1.5% de agarose da primeira reacção de PCR da técnica de “Genome Walking” no sentido do N-terminal	91
Figura I.4.7. Gel de 1.5% de agarose da segunda reacção de PCR da técnica de “Genome Walking” no sentido do N-terminal	92
Figura I.4.8. Sequência do fragmento de ADN da CCP de <i>Ps. stutzeri</i> com a respectiva sequência de aminoácidos por ela codificada, obtida através da técnica de “Genome Walking” no sentido do N-terminal	92
Figura I.4.9. Localização na sequência de ADN da CCP de <i>Ps. stutzeri</i> , dos iniciadores PS8 e PS9	93
Figura I.4.10. Gel de 1.5% de agarose da primeira reacção de PCR da técnica de “Genome Walking” no sentido do C-terminal	94
Figura I.4.11. Gel de 1.5% de agarose da segunda reacção de PCR da técnica de “Genome Walking” no sentido do C-terminal	95
Figura I.4.12. Fragmento da sequência de ADN da CCP de <i>Ps. stutzeri</i> com a respectiva sequência de aminoácidos por ela codificada, obtido através da técnica de “Genome Walking” no sentido do C-terminal	96
Figura I.4.13. Sequência total de ADN da CCP de <i>Ps. stutzeri</i>	97
Figura I.4.14. Comparação da sequência da CCP de <i>Ps. stutzeri</i> com a localização proposta para o sítio II de ligação ao cálcio na CCP de <i>Pa. denitrificans</i> e com a sequência <i>consensus</i> encontrada nas proteínas contendo barris- $\beta$	98
Figura I.4.15. Comparação das sequências de aminoácidos das CCP's bacterianas isoladas de <i>Ps. stutzeri</i> , <i>Ps. aeruginosa</i> , <i>Ps. nautica</i> , <i>Pa. denitrificans</i> e <i>N. europaea</i> .	98
Figura I.4.16. Representação esquemática da sequência de aminoácidos da CCP de <i>Ps. stutzeri</i> , evidenciando os ligandos axiais dos hemo e as cisteínas que os ligam covalentemente à cadeia polipeptídica.	99
Figura I.5.1. Dois homotetrâmeros e uma célula unitária mostrando o empacotamento cristalográfico	104
Figura I.5.2. Homotetrâmero cristalográfico	106



Figura I.5.3. Estrutura tridimensional do dímero funcional da CCP de <i>Ps. stutzeri</i> determinada por Cristalografia de Raios-X	107
Figura I.5.4. Estrutura tridimensional da CCP de <i>Ps. stutzeri</i> determinada por Cristalografia de Raios-X evidenciando a coordenação dos hemos e do cálcio	107
Figura I.5.5. Comparação da coordenação dos hemos e do cálcio nas CCP's de <i>Ps. stutzeri</i> , <i>Ps. aeruginosa</i> , <i>Ps. nautica</i> e <i>N. europaea</i>	110
Figura I.6.1. Mecanismo de activação proposto para a CCP de <i>Ps. stutzeri</i>	117
Figura II.1.1. Representação em diagrama das orbitais moleculares da configuração electrónica da molécula de NO	126
Figura II.1.2. Ataque do NO aos centros ferro enxofre das proteínas	129
Figura II.1.3. O Ciclo do Azoto	132
Figura II.1.4. Representação esquemática da via metabólica da desnitrificação com a indicação das enzimas que catalisam cada reacção	135
Figura II.1.5. Organização da cadeia de transporte electrónico de <i>Ps. stutzeri</i> .	135
Figura II.1.6. Estrutura dos hemos <i>b</i> , <i>o</i> e <i>a</i>	139
Figura II.1.7. Representação esquemática dos cinco tipos de HCO terminais	140
Figura II.1.8. Representação esquemática da superfamília das oxidases hemo-cobre	142
Figura II.1.9. Esquema da cNOR	143
Figura II.1.10. Provável ciclo catalítico da NOR	149
Figura II.1.11. Esquema do modelo proposto para a estrutura da NORB por analogia com a subunidade I das HCO	155
Figura II.2.1. Perfil de eluição da coluna DEAE-Biogel A	168
Figura II.2.2. Perfil de eluição da primeira injeção na coluna CHT-I com um gradiente crescente em tampão fosfato entre 0 e 1.5 M	169
Figura II.2.3. Perfil de eluição da segunda injeção na coluna CHT-I com um gradiente crescente entre 100 e 1500 mM de KPi	170
Figura II.2.4. Géis de Tricina SDS-PAGE das várias fracções ao longo da segunda injeção na coluna CHT-I	170

Figura II.2.5. Gel de Tricina SDS-PAGE da fracção pura da NOR de <i>Ps. nautica</i>	171
Figura II.2.6. Gráfico da actividade específica da NOR em função da concentração de proteína na mistura reaccional. Para a realização destes ensaios fizeram-se diferentes diluições a partir do mesmo “stock” de enzima.	172
Figura II.2.7. Gráfico da actividade específica da NOR em função da concentração de proteína na mistura reaccional	173
Figura II.2.8. Esquema da purificação da NOR de <i>Pseudomonas nautica</i> 617	174
Figura II.3.1. Espectros de UV/visível da NOR de <i>Ps. nautica</i> em tampão 100 mM KPi pH=7, 0.05% DM, 0.01% FE	181
Figura II.3.2. Espectros de RPE da NOR de <i>Ps. nautica</i> em tampão 100 mM KPi, pH=7, 0.05% DM, 0.01% FE	183
Figura II.3.3. Efeito do NO nos espectros de RPE da NOR de <i>Ps. nautica</i> reduzida com ditionito de sódio	186
Figura II.3.4. Efeito do NO nos espectros de RPE da NOR de <i>Ps. nautica</i> reduzida com ditionito de sódio	187
Figura II.3.5. Simulações das espécies hémicas ligadas a $^{14}\text{NO}$	190
Figura II.3.6. Simulações das espécies hémicas ligadas a $^{15}\text{NO}$	191
Figura II.4.1. Comparação das sequências de aminoácidos das subunidades NORB das redutases do óxido nítrico bacterianas isoladas de <i>Ps. aeruginosa</i> , <i>Ps. stutzeri</i> , <i>Pa. denitrificans</i> e <i>Pa. halodenitrificans</i>	198
Figura II.4.2. Gel de 1% de agarose do produto da reacção de PCR com os iniciadores NO1 e NO2	199
Figura II.4.3. Sequência de ADN da NORB de <i>Ps. nautica</i> e respectivos aminoácidos por ela codificados, obtida através do fragmento amplificado pela reacção de PCR com os iniciadores NO1 e NO2	200
Figura II.4.4. Localização, na sequência de ADN da NORB de <i>Ps. nautica</i> , dos iniciadores NO6 e NO5	202
Figura II.4.5. Gel de 1.5% de agarose da primeira reacção de PCR da técnica de “Genome Walking” no sentido do N-terminal da NORB	203

Figura II.4.6. Gel de 1.5% de agarose da segunda reacção de PCR da técnica de “Genome Walking” no sentido do N-terminal da NORB	204
Figura II.4.7. Sequência de ADN do N-terminal da NORB de <i>Ps. nautica</i> com a obtida através da técnica de “Genome Walking”	205
Figura II.4.8. Localização na sequência de ADN da NORB de <i>Ps. nautica</i> , dos iniciadores NO9 e NO10	206
Figura II.4.9. Gel de 1.5% de agarose da primeira reacção de PCR da técnica de “Genome Walking” no sentido do C-terminal da NORB	207
Figura II.4.10. Gel de 1.5% de agarose da segunda reacção de PCR da técnica de “Genome Walking” no sentido do C-terminal da NORB	208
Figura II.4.11. Fragmento da sequência de ADN da NORB de <i>Ps. nautica</i> obtido através da técnica de “Genome Walking” no sentido do C-terminal	209
Figura II.4.12. Fragmento da sequência de ADN da NORC de <i>Ps. nautica</i> obtido através da técnica de “Genome Walking” no sentido do N-terminal da NORB	210
Figura II.4.13. Localização na sequência de ADN da NORC de <i>Ps. nautica</i> , dos iniciadores NO7 e NO8	210
Figura II.4.14. Gel de 1.5% de agarose da primeira reacção de PCR da técnica de “Genome Walking” no sentido do N-terminal da NORC	211
Figura II.4.15. Gel de 1.5% de agarose da segunda reacção de PCR da técnica de “Genome Walking” no sentido do N-terminal da NORC	212
Figura II.4.16. Fragmento da sequência de ADN da NORC de <i>Ps. nautica</i> obtido através da técnica de “Genome Walking” no sentido do N-terminal	213
Figura II.4.17. Sequência total de ADN da NORB de <i>Ps. nautica</i>	214
Figura II.4.18. Sequência total de ADN da NORC de <i>Ps. nautica</i>	215
Figura II.4.19. Comparação das sequências de aminoácidos das NORC de <i>Ps. nautica</i> , <i>Ps. aeruginosa</i> , <i>Ps. stutzeri</i> , <i>Pa. denitrificans</i> e <i>Pa. halodenitrificans</i>	215
Figura II.4.20. Comparação das sequências de aminoácidos das NORB de <i>Ps. nautica</i> , <i>Ps. stutzeri</i> , <i>Ps. aeruginosa</i> , <i>Pa. denitrificans</i> e <i>Pa. halodenitrificans</i>	216

Figura II.4.21. Modelo da estrutura tridimensional da subunidade NORB de <i>Ps. nautica</i> , obtido do programa SWISS-MODEL. Vista de topo	218
Figura II.4.21. Modelo da estrutura tridimensional da subunidade NORB de <i>Ps. nautica</i> , obtido do programa SWISS-MODEL. Vista de lado	218
Figura B.1. Recta de calibração para a determinação da concentração em ferro não hémico pelo método de TPTZ	249
Figura B.2. Recta de calibração para a determinação da quantidade de proteína pelo método de BCA	251
Figura B.3. Absorvância a 562 nm em função do volume dos padrões e amostras para a determinação da quantidade de proteína pelo método de BCA para proteínas membranares	252
Figura C.1. Exemplo de um espectro de absorção de ultravioleta do ADN	263
Figura C.2. Gel de 0.7% de agarose do marcador de pesos moleculares “1kB DNA ladder” (Promega)	264
Figura C.3. Gel de 1% de agarose para verificação do resultado da extracção de ADN plasmídico	267
Figura C.4. Gel de 1% de agarose da digestão de ADN plasmídico com <i>EcoRI</i> (Stratagene) para verificar a presença do fragmento inserido	267
Figura C.5. Gel de 0.5% de agarose do ADN genómico da <i>Ps. stutzeri</i> ATCC 11607 digerido com diferentes enzimas de restrição	269
Figura D.1. Exemplo de uma curva da absorvância a 550 nm em função do tempo, obtida durante o ensaio de actividade da CCP de <i>Ps. stutzeri</i>	274
Figura D.2. Exemplo de uma linearização do logaritmo da absorvância a 550nm subtraída da absorvância da mistura reaccional totalmente oxidada em função do tempo, para determinação da actividade da CCP de <i>Ps. stutzeri</i>	275
Figura D.3. Esquema do eléctrodo específico para NO ISO-NO (“World Precision Instruments”)	276
Figura D.4. Esquema da montagem usada na calibração do eléctrodo específico para NO	277

Figura D.5.	Registo de uma calibração do eléctrodo de NO	278
Figura D.6.	Recta de calibração do eléctrodo específico para NO	279
Figura D.7.	Montagem para obtenção do “stock” de NO	279
Figura D.8.	Montagem para os ensaios de actividade da NOR	280

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela I.1.1.	Superfamília das peroxidases bacterianas, de plantas e fungos	9
Tabela I.1.2.	Propriedades bioquímicas de diversas CCP's bacterianas	22
Tabela I.1.3.	Potenciais formais de oxidação-redução e efeito da adição de cálcio na actividade de diversas CCP's bacterianas	23
Tabela I.1.4.	Propriedades espectroscópicas das CCP's bacterianas	24
Tabela I.2.1.	Meios usados nos crescimentos e pH final de cada balão	36
Tabela I.3.1.	Resultados da análise de cálcio por Espectroscopia de Emissão de Plasma	51
Tabela I.3.2.	Calibração da coluna de exclusão molecular, Superdex-75	53
Tabela I.3.3.	Efeito da concentração da CCP de <i>Ps. stutzeri</i> no Rf em cromatografia de exclusão molecular	53
Tabela I.3.4.	Cromatografia de exclusão molecular das CCP's de <i>Ps. stutzeri</i> e <i>Pa. denitrificans</i> na coluna Sephadex G150-50	55
Tabela I.3.5.	Coeficientes de sedimentação, $s_{20,w}$ , para as CCP's de <i>Ps. stutzeri</i> e <i>Pa. denitrificans</i> em diferentes condições experimentais	57
Tabela I.3.6.	Máximos de absorção do espectro de UV-visível da CCP de <i>Ps. stutzeri</i> a pH=7.5, com e sem pré-tratamento com EGTA e em diferentes estados de oxidação	60
Tabela I.3.7.	Valores de g das ressonâncias observadas nos espectros de RPE da CCP de <i>Ps. stutzeri</i>	68
Tabela I.3.8.	Valores dos parâmetros cinéticos da CCP de <i>Ps. stutzeri</i> com cada um dos doadores electrónicos usados	70
Tabela I.3.9.	Actividades do centro catalítico da CCP de <i>Ps. stutzeri</i> com os dois doadores electrónicos usados e em diferentes estados de oxidação	72
Tabela I.3.10.	Actividades do centro catalítico da CCP de <i>Ps. stutzeri</i> com os dois doadores electrónicos usados com e sem adição de cálcio ao "stock" da enzima ou à mistura reaccional	72

Tabela I.5.1. Aminoácidos de cada monómero que estão envolvidos na interação do homotetrâmero cristalográfico	105
Tabela II.1.1. Propriedades bioquímicas das cNOR's purificadas até à data	144
Tabela II.1.2. Propriedades espectroscópicas das cNOR's conhecidas	147
Tabela II.1.3. Principais características dos diferentes tipos de NOR	152
Tabela II.3.1. Resultados da determinação do conteúdo em hemo <i>b</i> e <i>c</i> pelo método de Piridina-Hemocromogéneo	180
Tabela II.3.2. Resultados da determinação do conteúdo em ferro não hémico pelo método de TPTZ	180
Tabela II.3.3. Máximos de absorção do espectro de UV/visível da NOR de <i>Ps. nautica</i> a pH=7.0 nos estados oxidado e reduzido. Entre parêntesis encontra-se o valor de comprimento de onda do "ombro" existente na banda $\alpha$	182
Tabela II.3.4. Valores de <i>g</i> e quantificação do número de spins por proteína, das ressonâncias observadas no espectro de RPE da NOR oxidada de <i>Ps. nautica</i>	184
Tabela II.3.5. Parâmetros usados nas simulações do sinal hemo-NO dos espectros de RPE da NOR de <i>Ps. nautica</i>	189
Tabela A.1. Composição do meio de cultura para o crescimento da bactéria <i>Ps. stutzeri</i> ATCC 11607	231
Tabela A.2. Soluções para suplementar o meio de cultura para o crescimento de <i>Ps. stutzeri</i>	231
Tabela A.3. Composição da solução de oligoelementos (Solução de Starkey)	232
Tabela A.4. Densidades ópticas medidas ao longo do tempo para os balões A a H	232
Tabela A.5. Densidades ópticas medidas ao longo do tempo para os balões I a P	233
Tabela A.6. Densidades ópticas medidas ao longo do tempo para os balões Q a Z	233
Tabela A.7. Composição do meio de cultura para o crescimento da bactéria <i>Ps. nautica</i> 617	234

Tabela A.8.	Soluções para suplementar o meio de cultura para o crescimento de <i>Ps. nautica</i>	235
Tabela B.1.	Soluções para a formação de Esferoplastos	239
Tabela B.2.	Soluções para o método de coloração de hemoss	241
Tabela B.3.	Soluções “stock” para a electroforese de proteínas membranares	242
Tabela B.4.	Volumes necessários à preparação de um gel de Tricina SDS-PAGE	243
Tabela B.5.	Soluções “stock” de Piridina/NaOH para a determinação simultânea da concentração em hemoss <i>b</i> e <i>c</i> .	246
Tabela B.6.	Valores a multiplicar pela absorvância a cada comprimento de onda de forma a quantificar hemoss <i>c</i> e <i>b</i> .	247
Tabela B.7.	Soluções para a determinação da concentração de ferro não hémico pelo método do TPTZ.	247
Tabela B.8.	Preparação da recta de calibração para a determinação da concentração em ferro não hémico pelo método de TPTZ.	248
Tabela B.9.	Preparação da recta de calibração para a determinação da quantidade total de proteína pelo método de BCA	250
Tabela C.1.	Componentes e concentrações usados nas reacções de PCR	262
Tabela C.2.	Reacção de ligação ao vector pGEM-T Easy	265
Tabela C.3.	Soluções e meios usados no isolamento de ADN plasmídico	265
Tabela D.1.	Soluções usadas na calibração do eléctrodo específico para NO	276
Tabela D.2.	Exemplo de uma calibração do eléctrodo de NO com a concentração de NO produzido e a resposta dada pelo eléctrodo	278
Tabela D.3.	Componentes usados na mistura reaccional do ensaio da redutase do óxido nítrico	280



## INTRODUÇÃO

Esta tese apresenta duas partes distintas, cada uma com uma introdução, capítulos referentes aos dados obtidos experimentalmente e discussão final dos mesmos com as respectivas conclusões. Foi assim organizada por tratar de duas enzimas distintas, uma peroxidase do citocromo *c* e uma redutase do óxido nítrico, que não fazem parte de uma mesma via metabólica e que foram isoladas de bactérias diferentes, *Pseudomonas stutzeri* no caso da primeira e *Pseudomonas nautica* no caso da segunda. Os estudos realizados para cada uma delas foram feitos com o objectivo de elucidar aspectos distintos da actuação e estrutura de cada enzima. Apesar disso, existem importantes elos de ligação entre as duas enzimas, o que faz com que pertençam ao mesmo projecto de doutoramento: ambas são isoladas de bactérias desnitrificantes e ambas possuem no centro activo ferro hémico. No entanto, a ligação mais forte existente entre elas é o facto de ambas catalisarem uma reacção de redução de uma espécie oxidante derivada do oxigénio molecular ( $H_2O_2$  num caso e NO no outro). Ambos os substratos são substâncias tóxicas, altamente reactivas, produzidas durante o metabolismo celular, com tendência para uma maior acumulação quando as células são crescidas em condições de limitação de oxigénio. Ambos reagem com o oxigénio ou com o ião superóxido produzindo espécies ainda mais oxidantes, capazes de reagir com praticamente todas as substâncias orgânicas conhecidas. São portanto enzimas fundamentais na viabilidade das células perante a ameaça de um ambiente oxidante, em que não conseguiriam sobreviver sem este tipo de defesas. O interesse no estudo destas duas enzimas passa também por diversos processos biológicos de inflamação e de regulação da resposta imunitária em que tanto o NO como o  $H_2O_2$  participam.

Na primeira parte da tese são descritos os estudos realizados na peroxidase do citocromo *c* de *Pseudomonas stutzeri*. Estes tiveram como objectivo a elucidação do papel do cálcio neste tipo de enzimas e a compreensão do seu mecanismo de activação. Existe uma questão sempre presente ao longo desta primeira parte: será a presença de cálcio e o seu papel regulador da actividade das peroxidases do citocromo *c* um factor comum ou de diferenciação entre as enzimas isoladas de diferentes microrganismos?

Na segunda parte descreve-se a purificação e caracterização da redutase do óxido nítrico de *Pseudomonas nautica*, a enzima da via da desnitrificação que representa um maior desafio para os bioquímicos. Até recentemente ainda se debatia a existência do NO como um intermediário livre desta via metabólica devido ao facto de a sua concentração a nível celular

ser mantida em valores bastante reduzidos e de não se ter a certeza da existência da redutase do óxido nítrico. Esta foi a última enzima da desnitrificação a ser obtida numa forma pura por ser uma proteína integral da membrana, instável quando extraída, e o seu ensaio de actividade ser difícil. A sua purificação numa forma activa é um processo complicado e dispendioso, que apresenta baixo rendimento, pelo que a sua caracterização a nível espectroscópico não se encontra ainda muito desenvolvida. Tendo em conta o que foi dito, na segunda parte desta tese o passo fundamental foi a obtenção, numa forma pura e activa, de uma enzima que apenas havia sido isolada de um pequeno grupo de microrganismos e nunca antes obtida a partir da bactéria *Pseudomonas nautica*. Pretende-se que a caracterização desta enzima ainda pouco conhecida, ajude a perceber o seu funcionamento e estrutura a nível dos co-factores, em especial do centro activo onde ocorre a redução do óxido nítrico. A importância do conhecimento da redutase do óxido nítrico prende-se com aspectos tão diversos como a respiração de oxigénio, pois pensa-se que a oxidase do citocromo *c* poderá ter evoluído a partir da redutase do óxido nítrico, o efeito de estufa provocado pelo NO, e os diversos processos biológicos dos mamíferos em que esta molécula entra como sinalizadora.

---

---

## PARTE I

### A PEROXIDASE DO CITOCROMO *c* DE *Pseudomonas stutzeri*

---

---

Capítulo 1 – As Peroxidases Bacterianas – Papel do Cálcio .....	3
Capítulo 2 – Crescimento e Purificação .....	31
Capítulo 3 – Caracterização Bioquímica e Espectroscópica .....	49
Capítulo 4 – Sequenciação da Peroxidase do Citocromo <i>c</i> de <i>Pseudomonas stutzeri</i> .....	81
Capítulo 5 – Estrutura Tridimensional por Cristalografia de Raios-X e Implicações Mecanísticas.....	101
Capítulo 6 – Discussão e Conclusão.....	113

## *CAPÍTULO 1*

---

---

# As Peroxidases Bacterianas – Papel do Cálcio

---

---

Capítulo 1 – As Peroxidases Bacterianas – Papel do Cálcio

1. Introdução .....	5
1.1. Metabolitos Reactivos de Oxigénio.....	5
2. As Peroxidases .....	7
2.1. As Peroxidases Bacterianas .....	9
2.1.1. A Peroxidase do Citocromo <i>c</i> de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	10
2.1.1.1. A Forma Oxidada .....	11
2.1.1.2. A Forma Semi-Reduzida.....	11
2.1.1.3. A Forma Reduzida.....	12
2.1.1.4. O Mecanismo Catalítico .....	13
2.1.2. A Peroxidase do Citocromo <i>c</i> de <i>Pseudomonas stutzeri</i> .....	14
2.1.3. A Peroxidase do Citocromo <i>c</i> de <i>Paracoccus denitrificans</i> .....	14
2.1.3.1. A Necessidade de Cálcio para a Activação .....	15
2.1.3.2. O Equilíbrio Dímero-Monómero .....	16
2.1.3.3. Os Dois Tipos de Sítios de Ligação para o Cálcio .....	17
2.1.3.4. A Forma Activa .....	18
2.1.3.5. Os Modelos Propostos para a Activação .....	18
2.1.3.5.1. Modelo I .....	19
2.1.3.5.1. Modelo II.....	19
2.1.4. Outras Peroxidases Bacterianas.....	21
3. Bibliografia .....	25

## 1. Introdução

O advento da produção de Oxigénio molecular ( $O_2$ ) através da fotólise da água, levada a cabo pelos organismos fotossintéticos, levou ao primeiro grande evento de poluição da atmosfera.

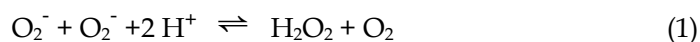
O  $O_2$  é uma substância paramagnética pouco usual pelo facto de ter dois electrões desemparelhados com o mesmo estado de spin [1]. Este facto leva a que, apesar de a redução do  $O_2$  ser um acontecimento termodinamicamente favorável, esta apenas se dê muito lentamente na ausência de um catalisador. Isto é, num par de electrões, antiparalelos entre si, um deles terá um spin paralelo aos electrões desemparelhados do  $O_2$ , necessitando portanto, de haver uma mudança no spin de um dos electrões, antes que o  $O_2$  os possa receber. Nas colisões ocasionais, o tempo de contacto é demasiado curto para que este acontecimento possa ocorrer [2]. É esta barreira cinética que nos mantém a salvo no ambiente tão fortemente oxidante em que vivemos.

### 1.1. Metabolitos Reactivos de Oxigénio

Durante a respiração celular, a redução incompleta do oxigénio molecular leva ao aparecimento de metabolitos reactivos de oxigénio (ou oxigénio activo) [2], como o peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ), o ião superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) ou o radical hidroxilo ( $HO^{\bullet}$ ). Estas espécies, são bastante mais reactivas do que o  $O_2$ , e conseguem por vezes levar a cabo reacções de auto-oxidação não enzimáticas, originando quebras em ambas as cadeias de ADN, produção de pontes dissulfureto ou oxidação de outros aminoácidos nas proteínas, e peroxidação dos lípidos com consequente diminuição da mobilidade das membranas celulares [3]. Das espécies anteriores, apenas o peróxido de hidrogénio não é uma espécie radicalar. Apesar disso, este continua a ser um perigoso oxidante citotóxico pelo facto de conter, tal como o  $O_2$ , dois electrões não emparelhados, e de estar assim, bastante receptivo a mais dois electrões. Além disso, catiões como o  $Fe(II)$  e o  $Cu(I)$  são capazes de transferir um terceiro electrão para o peróxido de hidrogénio, originando uma molécula de água e outra de radical hidroxilo (reacção de Fenton) [2-4]. Este último é um dos oxidantes mais potentes que se conhecem, sendo capaz de atacar qualquer uma das substâncias orgânicas presentes na célula, levando em última análise à morte celular.

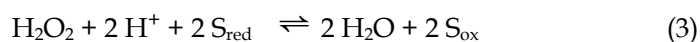
Para manter a viabilidade celular num ambiente tão fortemente oxidante, é necessário um processo de eliminação dos metabolitos reactivos de oxigénio. As células criaram, assim, numerosos mecanismos de defesa, tal como a acumulação de várias substâncias anti-oxidantes, incluindo o ácido ascórbico, o  $\beta$ -caroteno e a glutathione, ou a evolução de diversas famílias de enzimas que catalisam reacções de eliminação destas espécies, e o aparecimento de defesas secundárias que incluem sistemas de reparação do ADN e enzimas proteolíticas e lipolíticas [3]. A importância destes sistemas é fundamental na sobrevivência de seres que respiram oxigénio (seres aeróbios) ou mesmo dos que apenas vivem na sua presença, apesar de respirarem outras substâncias (seres anaeróbios aerotolerantes).

De entre as enzimas que eliminam os metabolitos reactivos de oxigénio temos as **dismutases do superóxido**, que catalizam a reacção de associação de duas moléculas de superóxido, originando uma molécula de peróxido de hidrogénio e outra de oxigénio (equação (1)).



São uma classe de enzimas ubíquas em células aeróbias mas muito diversificada, podendo conter cobre, zinco, manganésio, ferro ou até níquel no seu centro activo e localizar-se quer no citosol, quer em organelos subcelulares. No entanto, ao resolverem o problema do ião superóxido nas células, as dismutases do superóxido produzem mais  $\text{H}_2\text{O}_2$ , o qual é ainda uma substância tóxica.

As enzimas que eliminam o peróxido de hidrogénio, as hidropoxidases [5], classificam-se em: **catalases**, as quais catalisam a redução do  $\text{H}_2\text{O}_2$  usando como doadores electrónicos substâncias que possam dispor de dois electrões simultaneamente (equação 2) e **peroxidases**, as quais usam o potencial oxidante do  $\text{H}_2\text{O}_2$  para levar a cabo oxidações selectivas num grande número de substratos orgânicos capazes de doar apenas um electrão. A reacção típica das peroxidases encontra-se exemplificada na equação (3).



(Sendo  $\text{S}_{\text{red}}$  um substrato reduzido, e  $\text{S}_{\text{ox}}$  o mesmo substrato no estado oxidado)

As catalases são maioritariamente enzimas hémicas, existindo no entanto, algumas excepções, como as catalases contendo magnésio. Dentro das peroxidases, temos também uma maioria de proteínas hémicas, havendo no entanto, alguns exemplos não hémicos, como



as bromoperoxidasas de *Pseudomonas* (*Ps.*) *aeruginosa* e de *Ps. putida* ou a cloroperoxidase de *Ps. pyrrocinia* [5].

Não se conhece nenhum sistema enzimático para eliminar a mais reactiva das substâncias derivadas do oxigénio acima mencionadas, o radical hidroxilo, provavelmente porque o seu tempo de vida na célula é extremamente curto (cerca de  $10^{-9}$  segundos) e também porque a remoção do seu principal precursor, o  $H_2O_2$ , através dos sistemas enzimáticos das hidroperoxidasas, é já por si uma medida de protecção da célula bastante eficaz.

Apesar de todos os efeitos nocivos acima mencionados dos metabolitos reactivos de oxigénio, estes participam também em alguns importantes processos biológicos que ocorrem nas células dos seres mais complexos. A libertação de grandes quantidades de ião superóxido, produzido pelos leucócitos não só induz a morte dos microrganismos patogénicos, como aumenta a permeabilidade vascular e participa na morte celular. Além disso, a produção intracelular de metabolitos reactivos de oxigénio exerce um efeito fundamental na regulação da libertação de outros mediadores da resposta inflamatória. Resultados recentes indicam que o peróxido de hidrogénio poderá estar envolvido no mecanismo de activação dos linfócitos. Este metabolito actua como mensageiro secundário na iniciação e amplificação da sinalização no receptor do antigénio. Em paralelo, elevadas concentrações de peróxido de hidrogénio poderão ainda induzir a apoptose celular [6].

## 2. As Peroxidasas

Na redução do  $H_2O_2$  a  $H_2O$ , as peroxidases oxidam uma grande variedade de substratos, podendo ser classificadas de acordo com o substrato que usam. Existem assim, por exemplo, as peroxidases do ascorbato, enzimas muito específicas para este substrato e que se encontram nos cloroplastos e citosol das plantas, nas algas eucarióticas e muitas das cianobactérias; as peroxidases da lenhina e as peroxidases dependentes de  $Mn^{2+}$ , excretadas por alguns fungos; as haloperoxidasas que catalisam a halogenação de compostos orgânicos; ou as peroxidases do citocromo c (CCP), enzimas que catalisam a oxidação de citocromos do tipo c de baixa massa molecular e da azurina [5, 7].

A análise das sequências de aminoácidos e das estruturas tridimensionais das diversas peroxidases permitiu um outro tipo de classificação. Assim, as peroxidases hélicas foram divididas em duas grandes superfamílias [7]:

- **Superfamília das peroxidases de origem animal**, que inclui a peroxidase da tiróide, a mieloperoxidase e a lactoperoxidase.
- **Superfamília das peroxidases bacterianas, de plantas e de fungos**. Esta inclui enzimas tão diversas quanto as peroxidases do ascorbato, as peroxidases da lenhina ou as peroxidases do citocromo *c* de origem bacteriana e mitocondrial. Todas estas proteínas têm em comum sequências conservadas na sua estrutura primária, contendo histidinas, que são muito provavelmente ligandos dos hemos.

Esta última superfamília foi ainda dividida em classes por Karen Wellinder [7] em 1992. Na classe I, esta autora englobou enzimas tão diversas como as peroxidases bacterianas (como a peroxidase de *Escherichia coli* e a CCP de *Ps. aeruginosa*), a CCP de levedura (YCCP), e as peroxidases do ascorbato (encontradas tanto nos cloroplastos como no citosol). No entanto, face à descoberta, nos anos posteriores a esta publicação, de uma grande quantidade de peroxidases bacterianas com características muito semelhantes à CCP de *Ps. aeruginosa*, e que se destacam nitidamente dos restantes membros da classe, foi necessário alterar as classificações existentes de modo a subdividir a classe I em duas novas classes. Passam a existir, assim, quatro classes de peroxidases:

- **Classe I** – Peroxidases do Ascorbato e a CCP presente nas mitocôndrias de leveduras.
- **Classe II** – Peroxidases excretadas por fungos.
- **Classe III** – Peroxidases excretadas por plantas.
- **Classe IV** – Peroxidases bacterianas

Na tabela I.1.1, encontram-se alguns exemplos de cada uma das classes, bem como as suas principais características.

Tendo em conta todos os exemplos de peroxidases já apresentados, facilmente se pode concluir que o papel destas enzimas no metabolismo não se limita à eliminação do  $H_2O_2$ , mas passa também pela defesa (como é o caso da mieloperoxidase, da lactoperoxidase e da peroxidase da glutathione) e pela biotransformação (peroxidase da lenhina e da tiróide).

**Tabela I.1.1.** Superfamília das peroxidases bacterianas, de plantas e fungos. Principais características e elementos representativos de cada classe [5, 7-15].

Classe	Exemplos	Características principais
I	YCCP, peroxidase do ascorbato	São diméricas ou monoméricas. Não possuem $\text{Ca}^{2+}$ estrutural, não têm sequência sinal para o retículo endoplasmático
II	peroxidase da lenhina, peroxidase dependente de $\text{Mn}^{2+}$	Extracelulares. Possuem $\text{Ca}^{2+}$ estrutural, 4 pontes dissulfureto conservadas e na maioria dos casos cadeias laterais com hidratos de carbono. Possuem sequência sinal para excreção através do retículo endoplasmático
III	peroxidases de rábano, de nabo ou de amendoim	Extracelulares. Possuem 2 $\text{Ca}^{2+}$ estrutural, pontes dissulfureto (localização diferente da classe II) e na maioria dos casos cadeias laterais com hidratos de carbono. Possuem sequência sinal para excreção através do retículo endoplasmático.
IV	CCP's de <i>Ps. aeruginosa</i> , <i>Paracoccus denitrificans</i> , <i>Ps. stutzeri</i> , <i>Ps. nautica</i> , <i>Nitrosomonas europaea</i>	Contêm dois hemos do tipo c, são maioritariamente periplasmáticas, possuem $\text{Ca}^{2+}$ estrutural, são diméricas.

## 2.1. As Peroxidases Bacterianas

As peroxidases bacterianas são proteínas hélicas, geralmente periplasmáticas, possuindo dois hemos covalentemente ligados a uma única cadeia polipeptídica de aproximadamente 300 aminoácidos. De facto, é esta a grande diferença entre as peroxidases procarióticas e eucarióticas, já que estas últimas apenas possuem um hemo, o qual não se encontra covalentemente ligado.

Os elementos deste grupo melhor estudados, bioquímica e espectroscopicamente, são as peroxidases do citocromo c de *Ps. aeruginosa* [16] e de *Paracoccus (Pa.) denitrificans* [17, 18]. No entanto, foram já isoladas diversas CCP's periplasmáticas de organismos como *Ps. nautica* [19], *Ps. stutzeri* [20], *Nitrosomonas (N.) europaea* [21], *Rhodobacter (R.) capsulatus* [22], *Methylococcus (M.) capsulatus* [23] e mais recentemente uma CCP com características diferentes das anteriormente mencionadas, associada à membrana citoplasmática na bactéria *Neisseria gonorrhoeae* [24].

### 2.1.1. A Peroxidase do Citocromo *c* de *Pseudomonas aeruginosa*

Quando foi purificada pela primeira vez, por Ellfolk e Soininen, em 1970 [16], a CCP de *Ps. aeruginosa* foi considerada uma exceção entre as peroxidases de baixo peso molecular por possuir mais do que um hemo por monómero [25]. Hoje em dia, a grande maioria das CCP's bacterianas que se conhecem revelaram ser muito semelhantes à peroxidase de *Ps. aeruginosa*, pelo que esta pode ser tomada como um bom modelo de partida para o estudo das CCP's dihémicas bacterianas.

A peroxidase do citocromo *c* de *Ps. aeruginosa* é uma enzima homodimérica, com uma massa molecular de aproximadamente 36.2 kDa por monómero [26], encontrada no espaço periplasmático da bactéria (ver tabela I.1.2). Através da estrutura tridimensional, determinada por Cristalografia de Raios-X por Fullop *et al.* [27], verificou-se que cada monómero é constituído por dois domínios distintos, cada um deles contendo um hemo do tipo *c*, covalentemente ligado à sua cadeia de aminoácidos. Os dois hemos têm potenciais de oxidação-redução bastante diferentes [28], pelo que, frequentemente se designa o hemo ligado ao domínio que contém o N-terminal (com um potencial formal de oxidação-redução de -330 mV a pH=6 – ver tabela I.1.3) por hemo de baixo potencial (hemo BP) e o hemo ligado ao domínio que contém o C-terminal (com um potencial formal de oxidação-redução de +320 mV a pH=6) por hemo de alto potencial (hemo AP). A adição de ascorbato de sódio à CCP nativa apenas reduz o hemo AP, mantendo o hemo BP na forma férrica. Obtém-se, assim, uma **forma semi-reduzida**. Este estado de valência mista, que corresponde à forma activa, também pode ser conseguido através da incubação da enzima com o citocromo *c*<sub>551</sub> ou a azurina, previamente reduzidos, isolados do mesmo microrganismo [29-31]. Estas duas últimas proteínas poderão ser os doadores fisiológicos de electrões da peroxidase durante o mecanismo de redução do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na célula [32]. A adição de ditionito de sódio à CCP de *Ps. aeruginosa* reduz ambos os hemos, dando origem à forma ferrosa.

Estudos espectroscópicos por aplicação das espectroscopias de Ressonância de Raman [33], de Ressonância Paramagnética Electrónica (RPE) [34, 35] e de UV/visível [36], bem como estudos de Dicroísmo Circular [37], revelaram que os dois hemos da CCP de *Ps. aeruginosa* não são equivalentes, o que se reflecte tanto na coordenação axial do ferro, como no papel desempenhado no mecanismo de redução do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ou no estado de spin em que se encontram nos diferentes estados de oxidação da enzima [38]. Devido à complexidade do sistema, proceder-se-à à descrição separada de cada estado de oxidação da enzima de *Ps. aeruginosa* e só então à apresentação do modelo proposto para o seu mecanismo catalítico.

#### **2.1.1.1. A Forma Oxidada**

O espectro de UV/visível da forma férrica da CCP de *Ps. aeruginosa*, obtido à temperatura ambiente, apresenta máximos de absorção aos comprimentos de onda de 407 nm, 525 nm e 640 nm. Esta última banda é típica de compostos hémicos em configuração de spin alto possuindo um ligando fraco na sexta posição de coordenação [36, 38]. A existência de um hemo na configuração de spin alto foi também verificada através da espectroscopia de Ressonância de Raman [33].

À temperatura de 77 K, verificou-se a ausência no espectro de UV/visível da banda a 640 nm, o que é indicativo de uma alteração do estado de spin de um dos hemos com a diminuição da temperatura. A espectroscopia de RPE confirmou a existência de uma transição de spin dependente da temperatura. O espectro de RPE da forma oxidada desta CCP, a 15 K, apresenta um sinal de ferro hémico em configuração de spin alto ( $g \approx 5-6$ ) que corresponde a apenas uma muito pequena parte do ferro hémico existente e dois conjuntos de sinais típicos de hemos em configuração de spin baixo (com  $g_z=3.26$  e  $g_z=2.95$ ), correspondentes à grande maioria dos spins presentes na amostra (ver tabela I.1.4).

Na forma nativa (oxidada) da CCP de *Ps. aeruginosa*, o hemo AP possuiu uma coordenação axial metionina-histidina, encontrando-se à temperatura ambiente, num equilíbrio de spins entre os estados de spin alto e spin baixo [39, 40]. A metionina axial deste hemo encontra-se mais fracamente ligada ao ferro que o normal para os citocromos vulgares da classe c. Com a diminuição da temperatura, a metionina passa a estar mais fortemente ligada, fazendo com que o hemo AP passe a apresentar uma configuração de spin baixo. O hemo BP, por sua vez, possui, neste estado de oxidação, uma coordenação axial histidina-histidina, apresentando-se numa configuração de spin baixo. Na forma oxidada, a CCP é inativa, sendo necessária a redução prévia do hemo AP para que a enzima consiga catalisar a redução do  $H_2O_2$  a  $H_2O$  [27, 29, 33].

#### **2.1.1.2. A Forma Semi-Reduzida**

A redução do hemo AP dá origem à forma semi-reduzida da CCP de *Ps. aeruginosa*. O espectro de UV/visível desta forma apresenta o máximo de absorção da banda de sorlet a 420 nm, com um ombro a cerca de 400 nm que correspondente ao hemo BP na forma férrica. A banda de spin alto a 640 nm continua presente neste estado de oxidação (ver tabela I.1.4).

No espectro de RPE da forma semi-reduzida verifica-se a ausência de sinais de hemos em configuração de spin alto, bem como do conjunto de sinais com  $g_z=3.26$ , anteriormente referidos para a forma oxidada, e que correspondiam ao hemo AP. Os sinais correspondentes ao hemo BP diferem daqueles que estavam presentes no espectro da forma oxidada, tanto nos valores de  $g$  como na largura de linha, que se torna mais estreita. Isto sugere a existência de uma interação entre os dois hemos, de tal forma que a redução do hemo AP provoca uma alteração no ambiente em que se encontra o hemo BP [34, 41].

Com a redução, o hemo AP passa a coordenar mais fortemente a metionina axial. Continua a ter como ligandos axiais uma metionina e uma histidina, mas passa a apresentar uma configuração de spin baixo. O hemo BP, perde uma das suas histidinas axiais, tornando-se pentacoordenado e passando a apresentar uma configuração de spin alto. Há, portanto, uma alteração do estado de spin de ambos os hemos, fazendo com que a enzima passe à **forma activa**, na qual existe, no hemo BP, uma posição de coordenação livre para a ligação do substrato. Do que foi exposto, é fácil concluir que os dois hemos têm papéis diferentes na actividade catalítica da enzima. O hemo BP é o local onde se dá a redução do  $H_2O_2$  (**hemo\_peroxidático**) e o hemo AP têm apenas a função de aceitar os electrões do doador fisiológico (o citocromo  $c_{551}$  ou a azurina) e de os transferir durante o mecanismo catalítico para o hemo peroxidático (**hemo de transferência electrónica**) [29, 40].

Também neste estado de redução se verifica uma alteração do estado de spin dependente da temperatura, mas desta feita no hemo BP. Foi proposto que ao baixar a temperatura, voltasse a haver ligação de uma histidina na sexta posição de coordenação do hemo BP, que passava assim, a apresentar uma configuração de spin baixo. Às temperaturas de hélio líquido da caracterização espectroscópica por espectroscopia de RPE, ambos os hemos apresentam uma configuração de spin baixo.

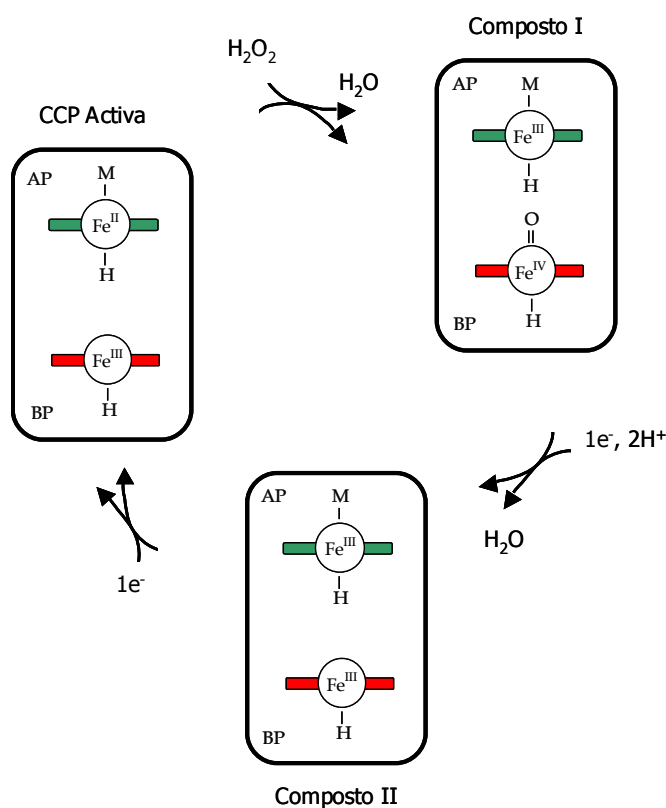
### **2.1.1.3. A Forma Reduzida**

A forma totalmente reduzida da CCP de *Ps. aeruginosa* é, tal como a forma oxidada, uma forma inactiva.

No espectro de UV/visível deixa de ser observada a banda a 640 nm, característica de uma configuração de spin alto. No entanto, a pronta ligação de CO ao hemo BP na forma totalmente ferrosa desta peroxidase sugere que este se mantém pentacoordenado [42].

### 2.1.1.4. O Mecanismo Catalítico

No mecanismo catalítico proposto por Ellfolk e Ronnberg [28, 30] para a CCP de *Ps. aeruginosa*, a reacção da enzima semi-reduzida, activa, com o peróxido de hidrogénio dá origem ao composto I, que apresenta uma estrutura  $\text{Fe}^{\text{III}} - \text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$  (ver figura I.1.1). Ao contrário do que acontece nas peroxidases monohémicas, nomeadamente na CCP de levedura [8], não há formação de um radical de triptofano, já que um dos electrões necessários à catálise é doado pelo hemo de transferência electrónica, que passa do estado ferroso a férrico, e o outro pelo próprio hemo peroxidático que forma uma espécie  $\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$ , bastante rara. Este intermediário é rapidamente convertido no composto II, uma espécie totalmente férrica, que no entanto deverá ser diferente do estado nativo da enzima, antes da activação.



**Figura I.1.1.** Ciclo catalítico proposto por Ellfolk e Ronnberg para a CCP de *Ps. aeruginosa*. Adaptado de Ellfolk *et al.* [28, 30].

### 2.1.2. A Peroxidase do Citocromo *c* de *Pseudomonas stutzeri*

A peroxidase do citocromo *c* de *Ps. stutzeri* (ATCC 11607), objecto de estudo desta dissertação, foi purificada pela primeira vez em 1984 por Villalain *et al.* [20]. No entanto já em 1969 [43] havia sido referida a existência em *Ps. stutzeri* de um citocromo com um peso molecular de 37 kDa em electroforese desnaturante, e uma banda  $\alpha$  a 558 nm com um ombro a 551 nm, que só mais tarde se provou ser uma peroxidase [44]. Esta CCP é uma enzima dihémica. Os dois hemos possuem potenciais formais de oxidação-redução bastante separados: um dos hemos é totalmente reduzido por ascorbato de sódio, enquanto que o outro apenas se reduz com ditionito de sódio. Assim, à semelhança do que acontece na enzima de *Ps. aeruginosa*, um hemo apresenta um potencial baixo, enquanto que o outro possui um potencial elevado.

Estudos de actividade desta enzima revelaram que o seu doador electrónico fisiológico mais provável é o citocromo  $c_{551}$  (ver tabela I.1.2) [20].

### 2.1.3. A Peroxidase do Citocromo *c* de *Paracoccus denitrificans*

A peroxidase do citocromo *c* de *Pa. denitrificans* é uma enzima muito semelhante, à CCP de *Ps. aeruginosa*, mas com diferenças de importância fundamental para a compreensão dos estudos realizados no âmbito desta tese.

É uma enzima periplasmática, com uma massa molecular de cerca de 37.5 kDa por monómero [45], isolada pela primeira vez em 1990 por Goodhew *et al.* [17]. À semelhança da enzima de *Ps. aeruginosa*, a CCP de *Pa. denitrificans* contém dois hemos do tipo *c*: um de baixo potencial (com um potencial formal de oxidação-redução entre -100 e -200 mV) e outro de alto potencial (com um potencial formal de oxidação-redução entre +176 mV e +226 mV - ver tabela I.1.3).

Na forma oxidada, os espectros de UV/visível e de RPE são muito semelhantes aos anteriormente descritos para a CCP de *Ps. aeruginosa* (ver tabela I.1.4.). Verifica-se a existência de uma banda de absorção típica de um sistema de spin alto a 640 nm. A coordenação axial dos hemos, bem como o seu estado de spin são idênticos aos descritos para a CCP de *Ps. aeruginosa* [46].

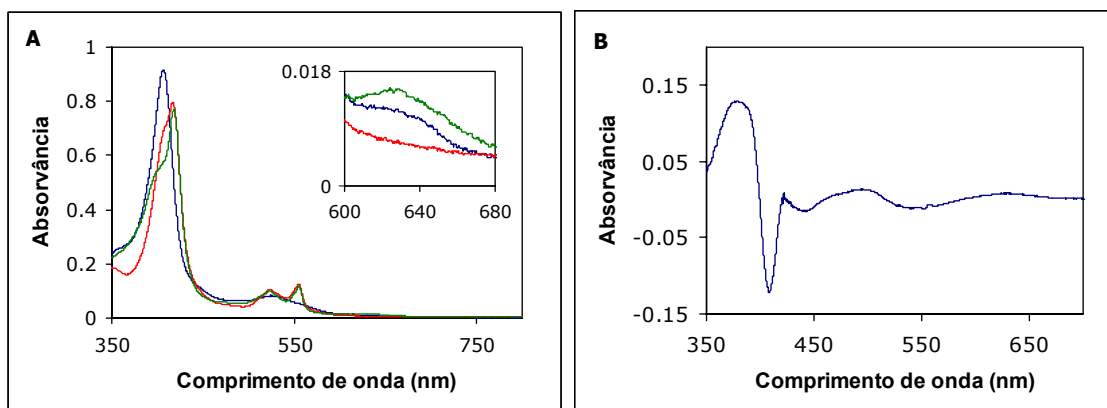


### 2.1.3.1. A Necessidade de Cálcio para a Activação

A incubação da CCP com o citocromo  $c_{550}$  (o seu provável doador fisiológico de electrões) ou com ascorbato de sódio e diaminodurol (DAD) dá origem à sua forma semi-reduzida [18].

Por espectroscopia de UV/visível, a pH = 6, verifica-se que a redução do hemo AP se completa 2 minutos após adição de ascorbato de sódio, mas o aparecimento das características de spin alto (o ombro na banda do solet e a banda a 640 nm) é um fenómeno que acontece muito mais lentamente. A pH = 7.5 o aparecimento das características de spin alto não ocorre sem adição de 1 mM de  $\text{CaCl}_2$ . A forma semi-reduzida, com os dois hemos em configuração de spin baixo, é totalmente inactiva. Se deixarmos passar algum tempo de incubação após semi-redução a pH = 6, a actividade e formação de spin alto obtidas sem adição de cálcio, são apenas cerca de 30% do total (após adição de cálcio).

Tendo em conta que pela primeira vez a semi-redução e a mudança de estado de spin do hemo BP puderam ser separadas temporalmente, o espectro de UV/visível de diferença entre as duas formas (antes e após mudança de spin) revela-nos as alterações ocorridas (ver figura I.1.2). Estas consistem num aumento de absorção a 380 nm e a 640 nm, com uma diminuição simultânea a 410 nm [46].



**Figura I.1.2.** Espectro de UV/visível da CCP de *Pa. denitrificans* a pH = 7.5. **A.** Espectro da CCP oxidada (—), semi-reduzida sem cálcio (—) e na presença de 1 mM  $\text{CaCl}_2$  (—). Em inserção encontra-se uma expansão da zona da banda de spin alto a 640 nm. **B.** Espectro de diferença entre a CCP semi-reduzida na presença e ausência de cálcio.

O espectro de RPE da CCP de *Pa. denitrificans*, um minuto após a semi-redução sem adição de cálcio, apresenta, ao contrário da CCP de *Ps. aeruginosa*, o conjunto de sinais correspondentes ao hemo BP inalterado relativamente ao espectro da forma oxidada. Após adição de cálcio, há uma diminuição da largura de linha, simultaneamente com uma alteração dos valores de *g*, idênticas às verificadas no espectro da CCP de *Ps. aeruginosa* semi-reduzida e justificadas pela forte interacção entre os dois hemos (ver tabela I.1.4) [46]. À temperatura a que se realiza este tipo de espectroscopia, era de esperar que ambos os hemos se encontrassem num estado de spin baixo, devido à já referida transição de spin com a diminuição da temperatura. Se após semi-redução a enzima se tivesse tornado activa, por libertação da sexta posição de coordenação do hemo peroxidático, o abaixamento da temperatura faria com que este hemo voltasse a assumir uma configuração de spin baixo. No entanto, a enzima teria sofrido alterações conformacionais, de tal forma que os sinais de RPE teriam diferentes valores de *g* e menor largura de linha.

Se permitirmos um maior tempo de incubação após a semi-redução sem cálcio, há alteração dos sinais correspondentes ao hemo BP, observando-se dois conjuntos de sinais típicos de hemos em spin baixo, com valores de *g* diferentes dos verificados no espectro da forma nativa (ver tabela I.1.4) e com uma largura de linha mais estreita. A adição de cálcio faz com que permaneça apenas um destes conjuntos de sinais (o da chamada espécie I) [46, 47].

Por tudo o que foi dito, é fácil concluir que, a alteração de configuração do hemo BP de spin alto para spin baixo, e consequentemente a activação da enzima com perda de uma histidina por parte deste hemo, são dependentes da presença de cálcio. A remoção de todo o cálcio residual com EGTA leva a uma forma inactiva da enzima em que, à temperatura ambiente, ambos os hemos adoptam uma configuração de spin baixo [48].

### **2.1.3.2. O Equilíbrio Dímero-Monómero**

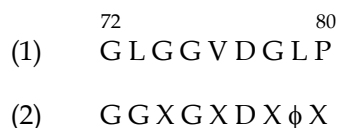
Se diluída, a CCP de *Pa. denitrificans* perde, progressivamente, a actividade ao longo do tempo. Esta é recuperada em caso de reconcentração da enzima. Tentativas para determinar o peso molecular por cromatografia de filtração em gel, revelaram que este é dependente da concentração de enzima aplicada. Pensa-se que este facto pode ser explicado pela ocorrência de um equilíbrio dímero-monómero, em que apenas o dímero é cataliticamente activo [49].

### 2.1.3.3. Os Dois Tipos de Sítios de Ligação para o Cálcio

A ligação do cálcio à CCP de *Pa. denitrificans* foi estudada através das espectroscopias de UV/visível e de RMN. Os resultados indicam a presença de dois tipos de sítios para a ligação do cálcio a esta enzima, com diferentes afinidades. Na enzima nativa, o sítio I encontra-se ocupado e não liga magnésio nem manganês, enquanto que o sítio II se encontra vazio a pH=7.5 ou em soluções diluídas da enzima, apresentando uma muito baixa afinidade para o cálcio. A semi-redução da enzima faz com que a afinidade do sítio II aumente, assemelhando-se à do sítio I. A presença de cálcio neste local é necessária para a ocorrência da saída da histidina da sexta posição de coordenação do hemo peroxidático, e consequentemente para a activação da enzima. Supõe-se que seja necessário preencher o sítio I antes que o cálcio se possa ligar ao sítio II [50].

A resolução da estrutura tridimensional por Cristalografia de Raios-X da CCP de *Ps. aeruginosa* [27] revelou a presença de um ião cálcio na interface dos dois domínios. A estequiometria da ligação a cada um dos sítios, bem como o facto de nunca se ter referido uma dependência de cálcio nesta CCP, fez com que se propusesse que o sítio I de ligação ao cálcio se localizasse entre os dois domínios, no local onde se verificou a sua existência na estrutura de *Ps. aeruginosa*. Existe, portanto, um sítio I por monómero.

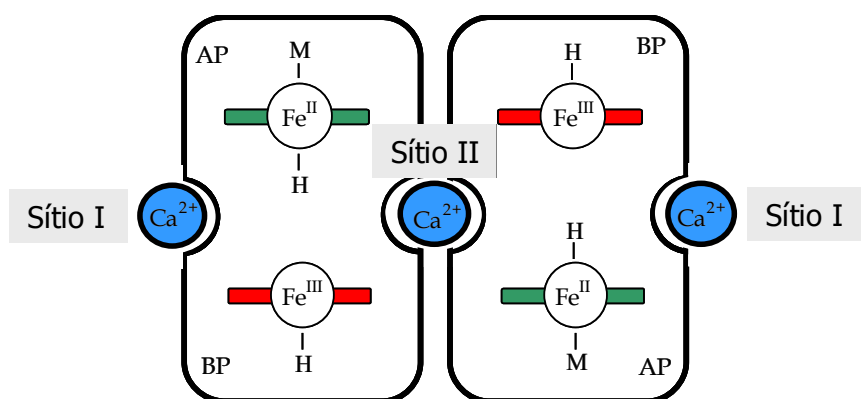
A comparação da estrutura primária da CCP de *Pa. denitrificans* com sequências de proteínas que ligam cálcio, revelou uma sequência candidata à localização do sítio II de ligação ao cálcio (ver figura I.1.3). No entanto, apenas existe uma sequência destas por monómero, pelo que se postulou que o sítio II deveria situar-se na interface do dímero. Isto seria consistente com a proposta do dímero funcional, anteriormente referida [45]. A ligação do cálcio neste sítio deverá levar à dimerização da enzima.



**Figura I.1.3.** Possível localização do sítio II de ligação ao cálcio na CCP de *Pa. denitrificans* e comparação com a sequência *consensus* encontrada nas proteínas contendo barris- $\beta$ . (1) CCP de *Pa. denitrificans*. (2) Sequência *consensus* (X é um resíduo qualquer e  $\phi$  é um resíduo hidrofóbico, com preferência para uma leucina) [45].

### 2.1.3.4. A Forma Activa

A forma activa da CCP de *Pa. denitrificans* é, tal como em *Ps. aeruginosa*, a forma semi-reduzida da enzima. No entanto, nesta CCP, é necessário a presença de dois iões cálcio nos sítios de ligação ao cálcio do tipo I (um por monómero) e um ião cálcio no sítio II, na interface do dímero (ver figura I.1.4). O hemo peroxidático adopta uma configuração de spin alto, encontrando-se pentacoordenado, com uma histidina na quinta posição de coordenação, e o hemo de transferência electrónica apresenta um spin baixo, com coordenação axial metionina-histidina [50]. A CCP encontra-se numa forma dimérica.



**Figura I.1.4.** A forma activa proposta por Gilmour e Pettigrew para a CCP de *Pa. denitrificans*. AP – hemo de alto potencial; BP- hemo de baixo potencial; M – metionina axial; H – histidina axial. Adaptado de Gilmour *et al.* [50].

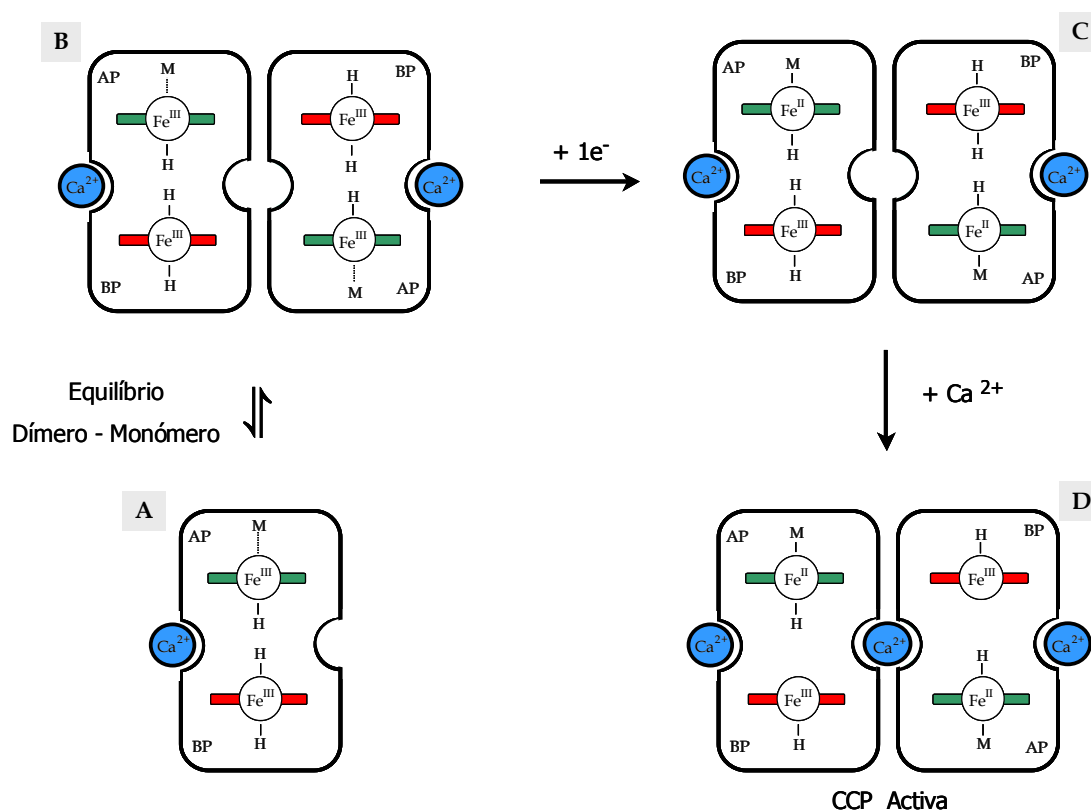
### 2.1.3.5. Os Modelos Propostos para a Activação

Foram propostos dois modelos para a activação desta CCP. Em ambos os modelos, o estado de repouso da enzima apresenta uma coordenação metionina-histidina (estando a histidina fracamente ligada) para o hemo do domínio C-terminal (hemo AP) e histidina-histidina para o hemo do domínio N-terminal (hemo BP). O hemo AP, encontra-se assim, num equilíbrio spin alto-spin baixo e o hemo BP em configuração de spin baixo.

A semi-redução da enzima faz com que o hemo AP passe a coordenar mais fortemente a sua metionina axial, passando de um equilíbrio de spins a uma configuração de spin baixo. Na ausência de cálcio a enzima será inactiva, pois ambos os hemos mantêm a sua esfera de coordenação completa, num estado de spin baixo.

### 2.1.3.5.1. Modelo I

No modelo I, (ver figura I.1.5) a semi-redução na presença de cálcio apenas implica a saída de uma histidina da esfera de coordenação do hemo BP, passando este a um estado de spin alto, pronto a ligar  $\text{H}_2\text{O}_2$ . A enzima encontra-se na forma activa [47, 51].



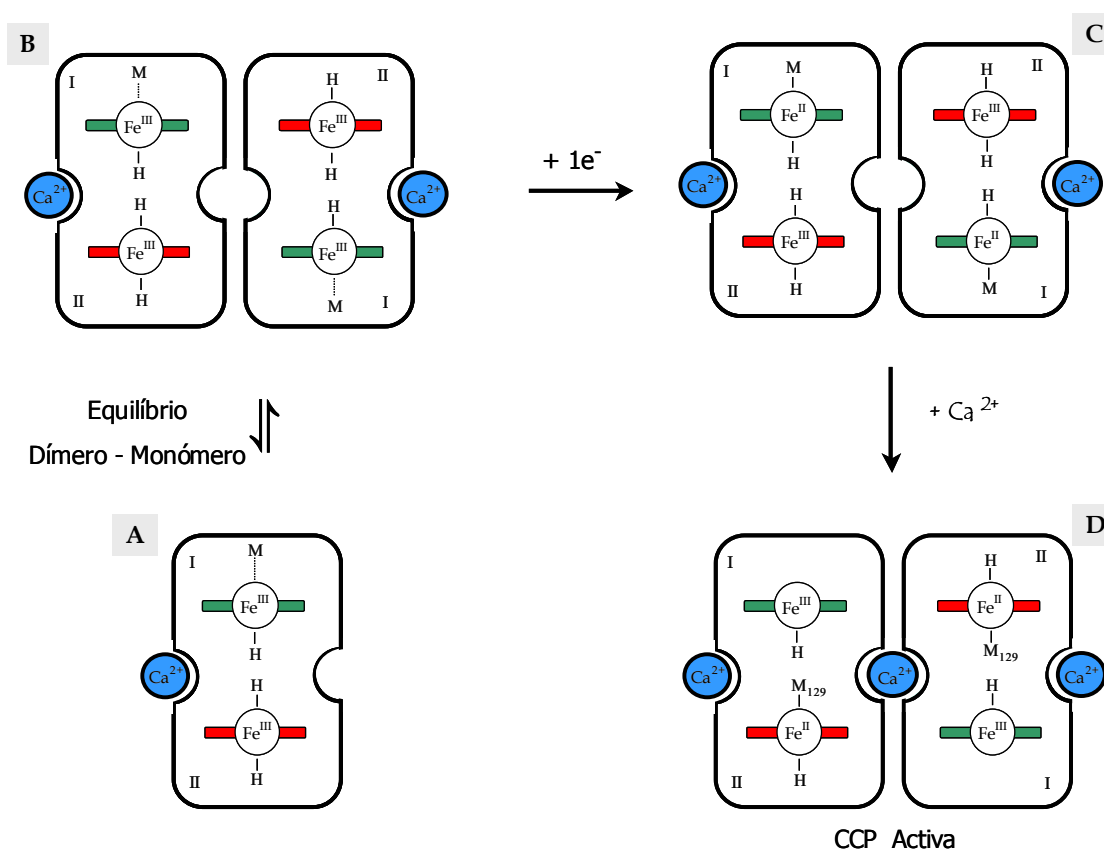
**Figura I.1.5.** Mecanismo de activação da CCP de *Pa. denitrificans*. Modelo I. **A** (monómero) e **B**. (dímero) Formas nativas da CCP que se encontram em equilíbrio. **C**. Forma semi-reduzida sem adição de cálcio (inactiva). **D**. Forma semi-reduzida com adição de cálcio. AP – hemo de alto potencial; BP- hemo de baixo potencial Adaptado a partir de Prazeres *et al.* [47] e Lopes *et al.* [51].

### 2.1.3.5.1. Modelo II

A comparação das sequências de aminoácidos das diversas peroxidases bacterianas conhecidas, revelou a existência de uma histidina (His-275 em *Pa. denitrificans*) e uma metionina (Met-129 em *Pa. denitrificans*) conservadas para além daquelas que são os ligandos

axiais dos hemos na forma oxidada. Este facto conjugado com as informações de que a modificação da His-275 faz com que a enzima não consiga adoptar a sua conformação activa [52], e que o composto II do mecanismo catalítico deverá ser diferente do estado oxidado de repouso da enzima, fez com que se propusesse um segundo modelo (modelo II) para a sua activação [47, 51].

No modelo II, (ver figura I.1.6) a redução na presença de cálcio do hemo situado no C-terminal (Centro I e hemo AP na enzima oxidada) faz com que haja uma alteração nas propriedades dos dois hemos.



**Figura I.1.6.** Mecanismo de activação da CCP de *Pa. denitrificans*. Modelo II. **A** (monómero) e **B**. (dímero) Formas nativas da CCP que se encontram em equilíbrio. **C**. Forma semi-reduzida sem adição de cálcio (inactiva). **D**. Forma semi-reduzida com adição de cálcio. **I** - hemo ligado ao domínio N-terminal - Centro I; **II**- hemo ligado ao domínio C-terminal - Centro II Adaptado a partir de Prazeres *et al.* [47] e Lopes *et al.* [51].

A entrada de um electrão no hemo C-terminal muda o seu potencial de alto para baixo, passando do estado ferroso ao férrico. Há saída da metionina da sua esfera de coordenação, passando a ligar apenas uma histidina, com a sexta posição de coordenação livre. Este hemo, agora com uma configuração de spin alto actua como hemo peroxidático. Por sua vez, o hemo situado no domínio N-terminal (Centro II e hemo BP na forma oxidada) substitui, na sua esfera de coordenação uma histidina pela metionina 129, continuando em configuração de spin baixo e alterando o seu potencial de baixo para alto. Este passa a actuar como hemo de transferência electrónica [47, 51]. Neste modelo, há uma inversão de potenciais e função de cada hemo.

#### **2.1.4. Outras Peroxidases Bacterianas**

Para além das CCP's atrás descritas existem outras com relevância para os estudos apresentados nesta dissertação.

A CCP isolada da bactéria *N. europaea*, ao contrário de todas as outras peroxidases bacterianas conhecidas, apresenta actividade de redução do  $H_2O_2$  tanto na forma oxidada como semi-reduzida [21]. A ligação de aniões à forma oxidada desta enzima, bem como a não existência de uma mudança de estado de spin dos hemos com a semi-redução, são indicativos de uma forma oxidada com um hemo peroxidático pentacoordenado, que possuiu uma posição de coordenação livre para ligar o  $H_2O_2$ . A recente resolução da estrutura tridimensional da forma oxidada desta CCP, através de Cristalografia de Raios-X, confirmou esta hipótese, revelando a primeira estrutura de uma peroxidase bacteriana na sua forma activa [53].

A bactéria marinha *Ps. nautica* possui uma CCP activa a elevada força iónica, em que se pensa que a interacção com o doador electrónico é de natureza hidrofóbica [19]. A CCP isolada desta bactéria apresenta uma necessidade de cálcio para a sua activação semelhante à que foi descrita para a CCP de *Pa. denitrificans*. Recentemente foram obtidas duas estruturas tridimensionais desta CCP por Cristalografia de Raios-X em duas formas diferentes: uma forma fechada, inactiva, sem cálcio e uma forma aberta, com cálcio, em que o hemo ligado ao domínio N-terminal se encontra pentacoordenado [54].

As várias estruturas tridimensionais conhecidas até ao momento serão descritas em mais pormenor no Capítulo 5.

Tabela I.1.2. Propriedades bioquímicas de diversas CCP's bacterianas

Bactéria	Peso Molecular (monômero)	Dímero (MM)	Doador fisiológico	V <sub>m</sub> (min <sup>-1</sup> )	K <sub>m</sub> (μM)	pH ótimo	Ref.
<i>Ps. aeruginosa</i>	36.2 kDa <sup>a</sup>	—	Cit. C <sub>551</sub> e azurina	42 600 (Cit. C <sub>551</sub> ) e 40 200 (azurina) <sup>b</sup>	91 (Cit. C <sub>551</sub> ) e 125 (azurina) <sup>b</sup>	6	[26, 32]
<i>Pa. denitrificans</i>	37.5 kDa <sup>c</sup>	monômero/ dímero	Cit. C <sub>550</sub>	85 000 <sup>d</sup>	13 <sup>d</sup>	6	[49]
<i>Ps. stutzeri</i>	37 kDa <sup>e</sup>	—	Cit. C <sub>551</sub>	21 238 <sup>f</sup>	—	—	[20]
<i>N. europaea</i>	44 kDa <sup>e</sup>	Sim <sup>g</sup> (90 kDa)	—	—	—	—	[21]
<i>R. capsulatus</i>	36.2 kDa <sup>a</sup>	Sim <sup>g</sup> (70 kDa)	Cit. C <sub>2</sub>	85 800 <sup>h</sup>	60 <sup>h</sup>	—	[55, 56]
<i>Ps. nautica</i>	36.5 kDa <sup>c</sup>	Sim <sup>g</sup> (57.5 kDa)	Cit. C <sub>552</sub>	116 000 <sup>i</sup>	122 <sup>i</sup>	—	[19]
<i>M. capsulatus</i>	35.8 kDa <sup>c</sup>	Sim <sup>g</sup> (78-80 kDa)	Cit. C <sub>555</sub>	425 <sup>j</sup>	0.51 <sup>j</sup>	7	[23]

<sup>a</sup> Obtido através da sequência de aminoácidos.

<sup>b</sup> [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>] = 84 μM, em 10 mM NaPi, pH=6

<sup>c</sup> Obtido por espectrometria de massa.

<sup>d</sup> Na presença de 1 mM CaCl<sub>2</sub>, [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>] = 18 μM, em Tampão 5 mM MES/5 mM HEPES, pH=6

<sup>e</sup> Obtido por de electroforese em condições desnaturantes

<sup>f</sup> [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>] = 38.5 μM, [Cit c] = 16 μM em 20 mM NaPi, pH=7.2

<sup>g</sup> Obtido através de cromatografia de Filtração em Gel

<sup>h</sup> Na presença de 1 mM CaCl<sub>2</sub>, [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>] = 18 μM, em Tampão HEPES 10 mM, pH=7.5

<sup>i</sup> Na presença de 1 mM CaCl<sub>2</sub>, [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>] = 16 μM, em Tampão 5 mM HEPES, pH=7.5

<sup>j</sup> [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>] = 33 μM, na presença de 13 mM guaiacol, em Tampão 50 mM fosfato pH=7



**Tabela I.1.3.** Potenciais formais de oxidação-redução e efeito da adição de cálcio na actividade de diversas CCP's bacterianas.

Bactéria	Potencias Formais de Oxidação-Redução (mV)		Adição de Ca <sup>2+</sup> estimula actividade	Ref.
	Hemo AP	Hemo BP		
<i>Ps. aeruginosa</i>	+320 <sup>a</sup>	-330 <sup>a</sup>	—	[28]
<i>Pa. denitrificans</i>	+176 (sem Ca <sup>2+</sup> ), +226 (com Ca <sup>2+</sup> ) <sup>b</sup>	[-200, -100] <sup>b</sup>	Sim	[46]
<i>N. europaea</i>	+450 <sup>c</sup>	-260 <sup>c</sup>	—	[21]
<i>R. capsulatus</i>	+270 <sup>d</sup>	[-310, -190] <sup>d</sup>	Não	[56]
<i>Ps. nautica</i>	—	—	Sim	[19]
<i>M. capsulatus</i>	+432 <sup>e</sup>	- 254 <sup>e</sup>	Não	[23]

<sup>a</sup> Determinado em Tampão 50 mM MES, pH=6

<sup>b</sup> Determinado em Tampão 5 mM MES/ 5 mM HEPES, pH = 7.5

<sup>c</sup> Determinado em Tampão 50 mM fosfato de potássio, pH=7

<sup>d</sup> Determinado em Tampão 10 mM HEPES pH=7.5

<sup>e</sup> Determinado em Tampão 50 mM Mops, pH=7, com 0.1 M KCl

Tabela I.1.4. Propriedades espectroscópicas das CCP's bacterianas.

Bactéria	Espectroscopia de UV/visível Máximos de Absorção (nm)				Espectroscopia de RPE Valores de g				Ref.
	nativa	Semi-reduzida		reduzida	nativa		Semi-reduzida		
		Sem adição de Ca <sup>2+</sup>	Com adição de Ca <sup>2+</sup>		Hemo AP	Hemo BP	Hemo BP		
							Sem ad. Ca <sup>2+</sup>	Adição de Ca <sup>2+</sup>	
<i>Ps. aeruginosa</i>	407, 525, 640	420, (com ombro), 524, (551-ombro) 557, 640	—	420, 524 (551-ombro) 557	g <sub>z</sub> =3.26 <sup>a</sup>	g <sub>z</sub> =2.95	2.83, 2.35, 1.54	—	[34-36]
<i>Pa. denitrificans</i>	409, 640	419, 525, 557	419 (com ombro), 525, 557, 640	—	g <sub>z</sub> =3.41 <sup>a</sup>	3.00, 2.27, 1.44	3.00, 2.27, 1.44 <sup>b</sup> 2.89, 2.32, 1.51 (espécie I) <sup>c</sup> 2.78, 2.40, 1.58 (espécie II) <sup>c</sup>	2.89, 2.32, 1.51	[46, 47]
<i>Ps. stutzeri</i>	620	522, 555, 620	—	—	g <sub>z</sub> =3.39 <sup>a</sup>	3.01,2.29, 1.41	2.94, 2.33, 1.46 g <sub>z</sub> =2.89 (minoritário)	—	[20]
<i>N. europaea</i>	408, 550, 630	418, 524, 554	—	—	g <sub>z</sub> =3.38 <sup>a</sup>	2.86, 2.38, 1.494 (espécie I) 2.81, 2.38, 1.547 (espécie II)	2.86, 2.38, 1.494 (espécie I) 2.81, 2.38, 1.547 (espécie II)	—	[21]
<i>R. capsulatus</i>	406, 630	420, 525, 556, 630	—						[22, 56]
<i>Ps. nautica</i>	407, 527.5, 640	(406-ombro) 417.5, 524.5, 556	(397-ombro), 419, 524.5, 556.5, 640	—	—	—	—	—	[19]
<i>M. capsulatus</i>	409, 630	(407-ombro) 419, 625	—	420, 526, 556	3.23, 2.02,1.8	2.79, 2.4,1.58	2.79, 2.4,1.58	—	[23]

<sup>a</sup> Sinal muito anisotrópico. Não se conseguem observar os valores de g<sub>y</sub> e g<sub>x</sub>.<sup>b</sup> Um minuto de incubação após a semi-redução.<sup>c</sup> 60 minutos de incubação após a semi-redução.

### 3. Bibliografia

1. **Fridovich, I.** (1998) "Oxygen toxicity: a radical explanation." *J Exp Biol* **201 ( Pt 8)**, 1203-1209
2. **McCord, J. M.** (2000) "The evolution of free radicals and oxidative stress." *Am J Med* **108**, 652-659
3. **Cabiscol, E., Tamarit, J. e Ros, J.** (2000) "Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species." *Int Microbiol* **3**, 3-8
4. **Kehrer, J. P.** (2000) "The Haber-Weiss reaction and mechanisms of toxicity." *Toxicology* **149**, 43-50
5. **Hochman, A.** (1993) "The diversity of bacterial hydroperoxidases." In *Plant Peroxidases: Biochemistry and Physiology*, ed. Welinder, K. G., Rasmussen, S. K., Penel, C. e Greppin, H., pp. 103-112, University of Geneva
6. **Guzik, T. J., Korb, R. e Adamek-Guzik, T.** (2003) "Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation." *J Physiol Pharmacol* **54**, 469-487
7. **Welinder, K. G.** (1992) "Superfamily of plant, fungal and bacterial peroxidases." *Curr Opin Struct Biol* **2**, 388-393
8. **Bosshard, H. R., Anni, H. e Yonetani, T.** (1991) "Yeast cytochrome c peroxidase." In *Peroxidases in Chemistry and Biology*, ed. Everse, J., Everse, K. E. e Grisham, M. B., pp. 51-84. Boca Raton, CRC Press
9. **Kang, S. O., Shin, K. S., Han, Y. H., Youn, H. D. e Hah, Y. C.** (1993) "Purification and characterisation of an extracellular peroxidase from white-rot fungus *Pleurotus ostreatus*." *Biochim Biophys Acta* **1163**, 158-164
10. **Welinder, K. G. e Gajhede, M.** (1993) "Structure and evolution of peroxidases." In *Plant Peroxidases: Biochemistry and Physiology*, ed. Welinder, K. G., Rasmussen, S. K., Penel, C. e Greppin, H., pp. 35-42, University of Geneva
11. **George, S. J., Kvaratskhelia, M., Dilworth, M. J. e Thorneley, R. N.** (1999) "Reversible alkaline inactivation of lignin peroxidase involves the release of both the distal and proximal site calcium ions and bishistidine co-ordination of the haem." *Biochem J* **344 Pt 1**, 237-244

12. **Sutherland, G. R., Zapanta, L. S., Tien, M. e Aust, S. D.** (1997) "Role of calcium in maintaining the heme environment of manganese peroxidase." *Biochemistry* **36**, 3654-3662
13. **Shiro, Y., Kurono, M. e Morishima, I.** (1986) "Presence of endogenous calcium ion and its functional and structural regulation in horseradish peroxidase." *J Biol Chem* **261**, 9382-9390
14. **Haschke, R. H. e Friedhoff, J. M.** (1978) "Calcium-related properties of horseradish peroxidase." *Biochem Biophys Res Commun* **80**, 1039-1042
15. **Dunford, H. B., Araiso, T., Job, D., Ricard, J., Rutter, R., Hager, L. P., Wever, R., Kast, W. M., Boelens, R., Ellfolk, N. e Ronnberg, M.** (1982) "Peroxidases." In *Biological chemistry of iron : a look at the metabolism of iron and its subsequent uses in living organisms : proceedings of the NATO Advanced Study Institute, held at Edmonton, Alberta, Canada, August 23-September 4, 1981*, ed. Dunford, H. B., pp. 337-355. Dordrecht, Holland ; Boston, D. Reidel published in cooperation with NATO Scientific Affairs Division
16. **Ellfolk, N. e Soininen, R.** (1970) "*Pseudomonas* cytochrome *c* peroxidase. I. Purification procedure." *Acta Chem Scand* **24**, 2126-2136
17. **Goodhew, C. F., Wilson, I. B., Hunter, D. J. e Pettigrew, G. W.** (1990) "The cellular location and specificity of bacterial cytochrome *c* peroxidases." *Biochem J* **271**, 707-712
18. **Pettigrew, G. W.** (1991) "The cytochrome *c* peroxidase of *Paracoccus denitrificans*." *Biochim Biophys Acta* **1058**, 25-27
19. **Alves, T., Besson, S., Duarte, L. C., Pettigrew, G. W., Girio, F. M., Devreese, B., Vandenberghe, I., Van Beeumen, J., Fauque, G. e Moura, I.** (1999) "A cytochrome *c* peroxidase from *Pseudomonas nautica* 617 active at high ionic strength: expression, purification and characterization." *Biochim Biophys Acta* **1434**, 248-259
20. **Villalain, J., Moura, I., Liu, M. C., Payne, W. J., LeGall, J., Xavier, A. V. e Moura, J. J. G.** (1984) "NMR and electron-paramagnetic-resonance studies of a dihaem cytochrome from *Pseudomonas stutzeri* (ATCC 11607) (cytochrome *c* peroxidase)." *Eur J Biochem* **141**, 305-312
21. **Arciero, D. M. e Hooper, A. B.** (1994) "A di-heme cytochrome *c* peroxidase from *Nitrosomonas europaea* catalytically active in both the oxidized and half-reduced states." *J Biol Chem* **269**, 11878-11886

22. **Hanlon, S. P., Holt, R. A. e McEwan, A. G.** (1992) "The 44-kDa c-type cytochrome induced in *Rhodobacter capsulatus* during growth with dimethylsulphoxide as an electron acceptor is a cytochrome c peroxidase." *FEMS Microbiology Letters* **97**, 283-288
23. **Zahn, J. A., Arciero, D. M., Hooper, A. B., Coats, J. R. e DiSpirito, A. A.** (1997) "Cytochrome c peroxidase from *Methylococcus capsulatus* Bath." *Arch Microbiol* **168**, 362-372
24. **Turner, S., Reid, E., Smith, H. e Cole, J.** (2003) "A novel cytochrome c peroxidase from *Neisseria gonorrhoeae*: a lipoprotein from a Gram-negative bacterium." *Biochem J* **373**, 865-873
25. **Ellfolk, N. e Soininen, R.** (1971) "*Pseudomonas* cytochrome c peroxidase. 3. The size and shape of the enzyme molecule." *Acta Chem Scand* **25**, 1535-1540
26. **Samyn, B., Van Craenenbroeck, K., De Smet, L., Vandenberghe, I., Pettigrew, G. e Van Beeumen, J.** (1995) "A reinvestigation of the covalent structure of *Pseudomonas aeruginosa* cytochrome c peroxidase." *FEBS Lett* **377**, 145-149
27. **Fulop, V., Ridout, C. J., Greenwood, C. e Hajdu, J.** (1995) "Crystal structure of the di-haem cytochrome c peroxidase from *Pseudomonas aeruginosa*." *Structure* **3**, 1225-1233
28. **Ellfolk, N., Ronnberg, M., Aasa, R., Andreasson, L. E. e Vanngard, T.** (1983) "Properties and function of the two hemes in *Pseudomonas* cytochrome c peroxidase." *Biochim Biophys Acta* **743**, 23-30
29. **Araiso, T., Ronnberg, M., Dunford, H. B. e Ellfolk, N.** (1980) "The formation of the primary compound from hydrogen peroxide and *Pseudomonas* cytochrome c peroxidase." *FEBS Lett* **118**, 99-102
30. **Ronnberg, M., Araiso, T., Ellfolk, N. e Dunford, H. B.** (1981) "The catalytic mechanism of *Pseudomonas* cytochrome c peroxidase." *Arch Biochem Biophys* **207**, 197-204
31. **Ronnberg, M., Araiso, T., Ellfolk, N. e Dunford, H. B.** (1981) "The reaction between reduced azurin and oxidized cytochrome c peroxidase from *Pseudomonas aeruginosa*." *J Biol Chem* **256**, 2471-2474
32. **Soininen, R. e Ellfolk, N.** (1972) "*Pseudomonas* cytochrome c peroxidase. IV. Some kinetic properties of the peroxidation reaction, and enzymatic determination of the extinction coefficients of *Pseudomonas* cytochrome c-551 and azurin." *Acta Chem Scand* **26**, 861-872

33. **Ronnberg, M., Osterlund, K. e Ellfolk, N.** (1980) "Resonance Raman spectra of *Pseudomonas* cytochrome *c* peroxidase." *Biochim Biophys Acta* **626**, 23-30
34. **Vanngard, T.** (1985) "Electron-paramagnetic-resonance studies of structure and function of the two-haem enzymes *Pseudomonas* cytochrome *c* peroxidase and beef heart cytochrome *c* oxidase." *Biochem Soc Trans* **13**, 619-622
35. **Aasa, R., Ellfolk, N., Ronnberg, M. e Vanngard, T.** (1981) "Electron paramagnetic resonance studies of *Pseudomonas* cytochrome *c* peroxidase." *Biochim Biophys Acta* **670**, 170-175
36. **Soininen, R. e Ellfolk, N.** (1973) "*Pseudomonas* cytochrome *c* peroxidase. V. Absorption spectra of the enzyme and of its compounds with ligands. Inhibition of the enzyme by cyanide and azide." *Acta Chem Scand* **27**, 35-46
37. **Ronnberg, M., Ellfolk, N. e Soininen, R.** (1979) "Circular dichroism studies on cytochrome *c* peroxidase and cytochrome *c*-551 of *Pseudomonas aeruginosa*." *Biochim Biophys Acta* **578**, 392-400
38. **Ronnberg, M. e Ellfolk, N.** (1979) "Heme-linked properties of *Pseudomonas* cytochrome *c* peroxidase. Evidence for non-equivalence of the hemes." *Biochim Biophys Acta* **581**, 325-333
39. **Foote, N., Peterson, J., Gadsby, P. M., Greenwood, C. e Thomson, A. J.** (1984) "A study of the oxidized form of *Pseudomonas aeruginosa* cytochrome *c*-551 peroxidase with the use of magnetic circular dichroism." *Biochem J* **223**, 369-378
40. **Foote, N., Peterson, J., Gadsby, P. M., Greenwood, C. e Thomson, A. J.** (1985) "Redox-linked spin-state changes in the di-haem cytochrome *c*-551 peroxidase from *Pseudomonas aeruginosa*." *Biochem J* **230**, 227-237
41. **Ellfolk, N., Ronnberg, M., Aasa, R., Vanngard, T. e Angstrom, J.** (1984) "Spin states and interactions between the hemes of *Pseudomonas* cytochrome *c* peroxidase." *Biochim Biophys Acta* **791**, 9-14
42. **Foote, N., Thompson, A. C., Barber, D. e Greenwood, C.** (1983) "*Pseudomonas* cytochrome *c*-551 peroxidase. A purification procedure and study of CO-binding kinetics." *Biochem J* **209**, 701-707
43. **Kodama, T. e Mori, T.** (1969) "A double peak *c*-type cytochrome, cytochrome *c*-552,558 of a denitrifying bacterium, *Pseudomonas stutzeri*." *J Biochem (Tokyo)* **65**, 621-628

44. Liu, M. Y., Liu, M. C., Payne, W. J., Peck, H. D., Jr. e LeGall, J. (1983) "Cytochrome components of denitrifying *Pseudomonas stutzeri*." *Curr Microbiol* **9**, 87-92
45. Hu, W., Van Driessche, G., Devreese, B., Goodhew, C. F., McGinnity, D. F., Saunders, N., Fulop, V., Pettigrew, G. W. e Van Beeumen, J. J. (1997) "Structural characterization of *Paracoccus denitrificans* cytochrome c peroxidase and assignment of the low and high potential heme sites." *Biochemistry* **36**, 7958-7966
46. Gilmour, R., Goodhew, C. F., Pettigrew, G. W., Prazeres, S., Moura, I. e Moura, J. J. G. (1993) "Spectroscopic characterization of cytochrome c peroxidase from *Paracoccus denitrificans*." *Biochem J* **294** ( Pt 3), 745-752
47. Prazeres, S., Moura, J. J. G., Moura, I., Gilmour, R., Goodhew, C. F., Pettigrew, G. W., Ravi, N. e Huynh, B. H. (1995) "Mossbauer characterization of *Paracoccus denitrificans* cytochrome c peroxidase. Further evidence for redox and calcium binding-induced heme-heme interaction." *J Biol Chem* **270**, 24264-24269
48. Prazeres, S., Moura, I., Moura, J. J. G., Gilmour, R., Goodhew, C. F. e Pettigrew, G. (1993) "Control of the spin state of the peroxidatic haem by calcium ions in cytochrome c peroxidase from *Paracoccus denitrificans*: A <sup>1</sup>H NMR study." *Magnetic Resonance in Chemistry* **31**, S68-S72
49. Gilmour, R., Goodhew, C. F., Pettigrew, G. W., Prazeres, S., Moura, J. J. G. e Moura, I. (1994) "The kinetics of the oxidation of cytochrome c by *Paracoccus* cytochrome c peroxidase." *Biochem J* **300** ( Pt 3), 907-914
50. Gilmour, R., Prazeres, S., McGinnity, D. F., Goodhew, C. F., Moura, J. J. G., Moura, I. e Pettigrew, G. W. (1995) "The affinity and specificity of Ca(2+)-binding sites of cytochrome-c peroxidase from *Paracoccus denitrificans*." *Eur J Biochem* **234**, 878-886
51. Lopes, H., Pettigrew, G., Moura, I. e Moura, J. J. G. (1998) "Electrochemical study on cytochrome c peroxidase from *Paracoccus denitrificans*: a shifting pattern of structural and thermodynamic properties as the enzyme is activated." *J Biol Inorg Chem* **3**, 632-642
52. McGinnity, D. F., Devreese, B., Prazeres, S., Van Beeumen, J., Moura, I., Moura, J. J. G. e Pettigrew, G. W. (1996) "A single histidine is required for activity of cytochrome c peroxidase from *Paracoccus denitrificans*." *J Biol Chem* **271**, 11126-11133
53. Shimizu, H., Schuller, D. J., Lanzilotta, W. N., Sundaramoorthy, M., Arciero, D. M., Hooper, A. B. e Poulos, T. L. (2001) "Crystal structure of *Nitrosomonas europaea*

- cytochrome *c* peroxidase and the structural basis for ligand switching in bacterial di-heme peroxidases." *Biochemistry* **40**, 13483-13490
54. **Dias, J. M., Alves, T., Bonifacio, C., Pereira, A. S., Bourgeois, D., Moura, I. e Romao, M. J.** (2004) "Structural basis for the mechanism of Ca<sup>2+</sup> activation of the di-heme cytochrome *c* peroxidase from *Pseudomonas nautica* 617." *Structure* (in press)
55. **Hu, W., De Smet, L., Van Driessche, G., Bartsch, R. G., Meyer, T. E., Cusanovich, M. A. e Van Beeumen, J.** (1998) "Characterization of cytochrome *c*-556 from the purple phototrophic bacterium *Rhodobacter capsulatus* as a cytochrome-*c* peroxidase." *Eur J Biochem* **258**, 29-36
56. **De Smet, L., Pettigrew, G. W. e Van Beeumen, J. J.** (2001) "Cloning, overproduction and characterization of cytochrome *c* peroxidase from the purple phototrophic bacterium *Rhodobacter capsulatus*." *Eur J Biochem* **268**, 6559-6568



## *CAPÍTULO 2*

---

---

### Crescimento e Purificação

---

---

Capítulo 2 – Crescimento e Purificação

1. Introdução .....	33
1.1. A Bactéria <i>Pseudomonas stutzeri</i> .....	33
1.2. O Citocromo $c_{551}$ de <i>Pseudomonas stutzeri</i> .....	34
2. O Crescimento da Bactéria <i>Pseudomonas stutzeri</i> .....	35
2.1. Optimização do Crescimento em Balão .....	35
2.2. Optimização do Crescimento em Fermentador .....	38
3. Purificação da Peroxidase do Citocromo $c$ .....	39
4. Purificação do Citocromo $c_{551}$ .....	44
5. Bibliografia .....	47

## 1. Introdução

Neste capítulo serão descritos os esforços realizados no sentido da optimização da expressão da CCP de *Ps. stutzeri*, bem como a sua purificação. Será também descrita a purificação do doador electrónico fisiológico, o citocromo  $c_{551}$ . No entanto, antes de começar a descrever o trabalho experimental, é importante fazer uma breve caracterização da bactéria e do citocromo  $c_{551}$ , os quais não foram ainda abordados com a profundidade merecida.

### 1.1. A Bactéria *Pseudomonas stutzeri*

*Pseudomonas stutzeri* pertence ao grupo dos organismos aérobios semelhantes a *Pseudomonas*. Estes, são bacilos Gram negativos unicelulares, com apenas um flagelo polar para lhes dar mobilidade, que não formam esporos. O seu metabolismo é respiratório e nunca fermentativo. [1].

*Pseudomonas stutzeri* é a espécie melhor caracterizada do grupo dos organismos desnitrificantes não-fluorescentes. É o organismo modelo no estudo da desnitrificação, sendo capaz de crescer em nitrato, nitrito ou óxido nítrico [2]. Esta espécie forma colónias com um aspecto pouco usual: castanho claro, de forma rugosa e aspecto seco e fortemente aderentes [1]. Os organismos a ela pertencentes são facilmente distinguidos dos outros organismos semelhantes a *Pseudomonas* pela sua capacidade de usar maltose e amido como fontes únicas de carbono e energia [3]. *Ps. stutzeri* possui uma amilase bacteriana única, a G<sub>4</sub>-amilase, que hidrolisa o amido produzindo  $\alpha$ -maltotetraose a partir das suas extremidades não redutoras [4]. Outras propriedades metabólicas de especial interesse são a degradação de diversos poluentes ambientais e glicóis de polietileno.

Estudos de hibridação ADN-ADN permitiram definir sete sub-grupos, denominados “gemovares” (grupos genómicos sem estatuto taxonómico). No entanto, dentro de cada “gemovar” existe grande variação de características fenotípicas, o que não permite que sejam separados em espécies diferentes [3, 5, 6].

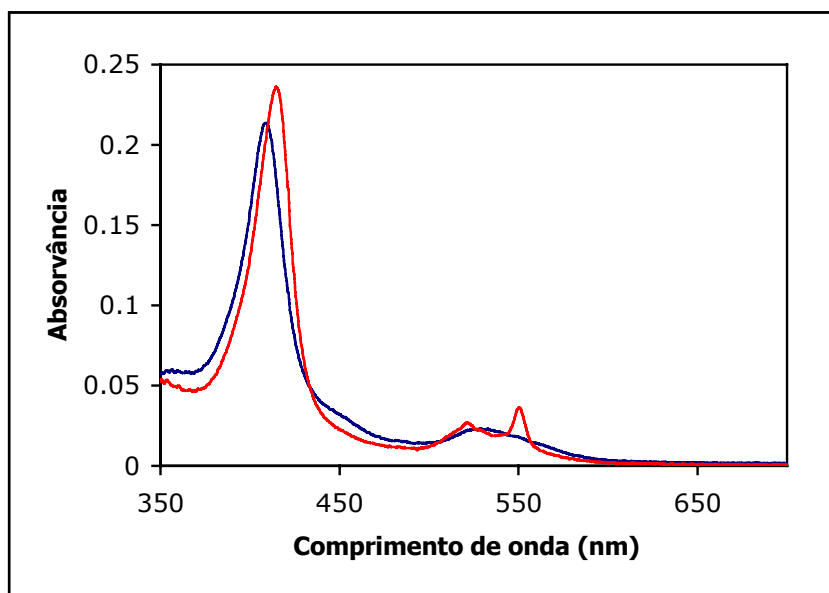
A estirpe *Ps. stutzeri* ATCC 11607, da qual foi purificada a CCP estudada nesta dissertação, é proveniente de um isolamento clínico anterior a 1952 e pertence ao “gemovar” 3, sendo a sua estirpe de referência [3, 6]. Apesar da existência de diversas estirpes de *Ps. stutzeri* provenientes de isolamentos clínicos, esta não é uma espécie reconhecidamente patogénica ou comensal.

## 1.2. O Citocromo $c_{551}$ de *Pseudomonas stutzeri*

O doador electrónico fisiológico da CCP de *Ps. stutzeri* é o citocromo  $c_{551}$  [7]. Esta classe de citocromos, também denominados citocromos  $c$ -8, são considerados os equivalentes funcionais dos citocromos  $c$  mitocôndriais. Estão presentes tanto nas células crescidas anaerobicamente como aerobicamente, pelo que deverão funcionar como doadores electrónicos de mais do que um tipo de enzimas [8]. O seu potencial formal de oxidação-redução a pH=7.5 é de aproximadamente 230 mV, conseguindo-se obter a sua redução completa por incubação com ascorbato de sódio [8, 9].

É um citocromo monohémico em que o grupo prostético se encontra covalentemente ligado a uma única cadeia polipeptídica de 82 aminoácidos. Apresenta uma coordenação axial metionina-histidina [10-12]. O seu peso molecular determinado por equilíbrio de sedimentação é aproximadamente 7 650 Da.

Na figura I.2.1. apresenta-se o espectro de UV/visível do citocromo  $c_{551}$  isolado de *Ps. stutzeri* nas formas oxidada e reduzida.



**Figura I.2.1.** Espectro de UV/visível do citocromo  $c_{551}$  de *Pseudomonas stutzeri* nas formas oxidada (—) e reduzida com 1 mM de ascorbato de sódio (—).

## 2. O Crescimento da Bactéria *Pseudomonas stutzeri*

### 2.1. Optimização do Crescimento em Balão

Com o objectivo de determinar qual a melhor fonte de carbono e de energia para o crescimento da bactéria *Ps. stutzeri*, experimentaram-se diversas condições de crescimento em balões Erlenmeyer. Partindo de um meio mineral com adição de extracto de levedura (ver composição dos meios no Apêndice A) várias fontes de carbono e de energia foram testadas, retirando-se amostras ao longo do crescimento para medição da densidade óptica. O pH inicial de cada meio de cultura foi ajustado a 7. Na tabela I.2.1 apresentam-se os diversos meios testados, indicando-se se foram ou não suplementados com ferro<sup>1</sup>, a concentração da fonte de carbono usada, bem como o pH final. As curvas de crescimento da bactéria *Ps. stutzeri* em cada um dos meios encontram-se nas figuras I.2.2, I.2.3 e I.2.4<sup>2</sup> (as tabelas com as densidades ópticas correspondentes a estas curvas de crescimento encontram-se no Apêndice A). Pretende-se uma fonte de carbono em que não haja inibição do crescimento até uma elevada concentração do nutriente, de forma a obter o maior rendimento possível em biomassa celular no crescimento em fermentador.

Através da observação da figura I.2.3 e da tabela I.2.1 podemos verificar que o lactato não é uma boa fonte de carbono para o crescimento em fermentador, uma vez que há inibição para a concentração de 13 g/l no meio de cultura. No meio contendo acetato não houve crescimento, ao passo que no meio contendo dextrose atingiu-se uma boa densidade óptica, mas as células não adquiriram o aspecto rosado dos crescimentos com lactato ou citrato, o que pode ser indicativo de pouco rendimento em citocromos. Assim sendo, escolheu-se o citrato como fonte de carbono e de energia para os restantes ensaios, verificando-se existir um bom nível de crescimento neste meio até uma concentração de 15 g/l de citrato por litro de meio de cultura.

---

<sup>1</sup> O ferro é importante para a obtenção de um alto rendimento em citocromos.

<sup>2</sup> As densidades ópticas foram medidas a 625 nm. No eixo das ordenadas de cada figura encontra-se representada o logaritmo da razão entre a densidade óptica em cada ponto (X) e a densidade óptica inicial (ao tempo zero - X<sub>0</sub>).

**Tabela I.2.1.** Meios usados nos crescimentos e pH final de cada balão.

Balão	Fonte de Carbono	Concentração (g/l)	Suplementado com Ferro <sup>a</sup>	pH Final
A	Citrato	5	+	8.30
B	Citrato	5	+	8.32
C	Citrato	5	-	8.30
D	Citrato	5	-	8.34
E	Citrato	13	+	8.33
F	Citrato	13	+	8.30
G	Citrato	13	-	8.32
H	Citrato	13	-	8.30
I	Lactato	5	+	7.80
J	Lactato	5	+	7.80
K	Lactato	5	-	7.90
L	Lactato	5	-	8.00
M	Lactato	13	+	— <sup>b</sup>
N	Lactato	13	+	— <sup>b</sup>
O	Lactato	13	-	— <sup>b</sup>
P	Lactato	13	-	— <sup>b</sup>
Q	Citrato	15	+	8.30
R	Citrato	15	+	8.34
S	Citrato	15	-	8.37
T	Citrato	15	-	8.34
U	Dextrose	10	-	3.76
V	Dextrose	10	-	3.79
X	Acetato	10	-	— <sup>b</sup>
Z	Acetato	10	-	— <sup>b</sup>

<sup>a</sup> (+) Adicionou-se 1 ml de uma solução de Fe 1 mg/ml por cada litro de meio; (-) Sem suplemento de Ferro.

<sup>b</sup> O pH não foi medido porque não houve crescimento nestes balões.

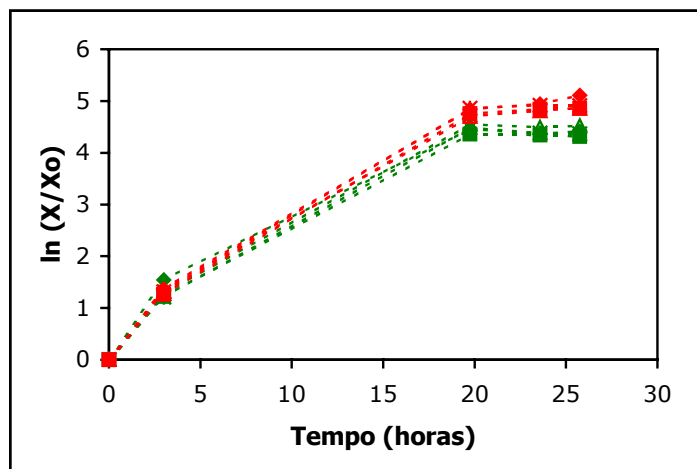


Figura I.2.2. Curvas de crescimento dos balões A a H.  $\blacklozenge$  A,  $\blacksquare$  B,  $\ast$  C,  $\triangle$  D,  $\blacklozenge$  E,  $\blacksquare$  F,  $\ast$  G e  $\triangle$  H.

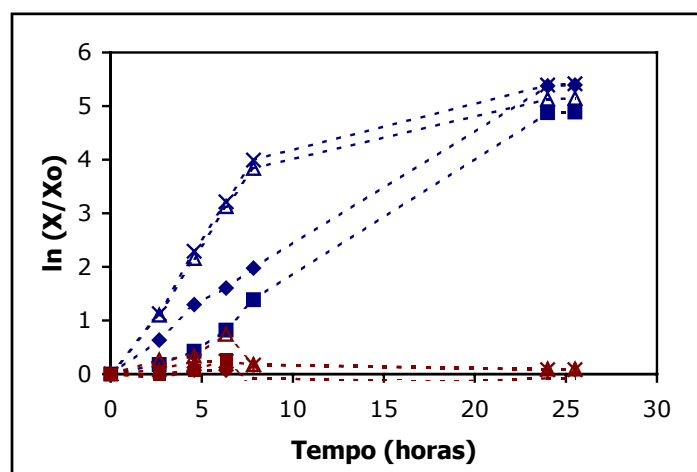


Figura I.2.3. Curvas de crescimento dos balões I a P.  $\blacklozenge$  I,  $\blacksquare$  J,  $\triangle$  K,  $\ast$  L,  $\blacklozenge$  M,  $\blacksquare$  N,  $\ast$  O e  $\triangle$  P.

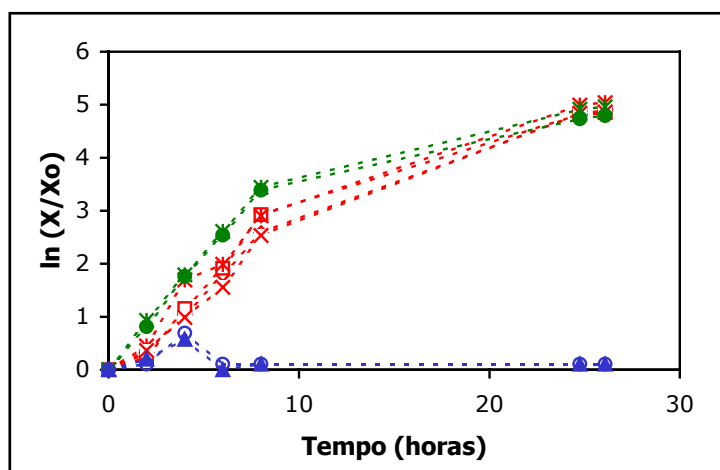


Figura I.2.4. Curvas de crescimento dos balões Q a Z.  $\diamond$  Q,  $\square$  R,  $\ast$  S,  $\times$  T,  $\ast$  U,  $\blacklozenge$  V,  $\diamond$  X e  $\blacktriangle$  Z.

## 2.2. Optimização do Crescimento em Fermentador

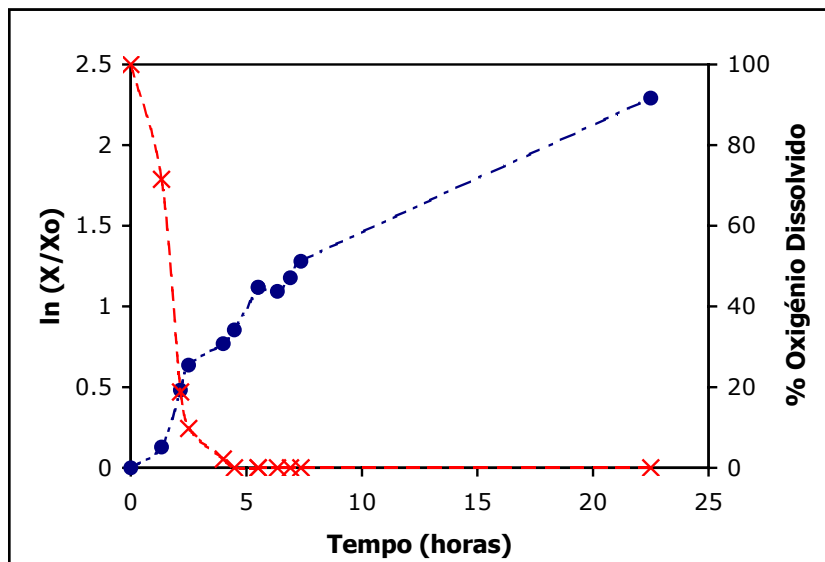
Os testes em balão Erlenmeyer permitiram a escolha do meio de cultura a usar. Com o objectivo de optimizar as restantes condições de crescimento da bactéria *Ps. stutzeri*, bem como a expressão da peroxidase do citocromo *c*, fizeram-se diversos crescimentos em pequenos fermentadores com capacidade para 1.5 litros de meio de cultura. Estes ensaios permitiram-nos verificar, que para além do meio de cultura, as seguintes condições de crescimento são fundamentais na optimização da expressão da CCP:

- **Arejamento:** A taxa de arejamento que permite uma maior expressão da CCP é 0.2 vvm (volume de ar por volume do reactor por minuto). Com uma taxa de arejamento de 1 vvm a quantidade desta proteína obtida não foi suficiente para se conseguir levar a purificação até ao fim, pelo que não foi possível quantificá-la.
- **pH:** Nos primeiros crescimentos realizados, o pH foi mantido a um valor de aproximadamente 7 por adição de HCl. No entanto, verificou-se que a não manutenção do pH, deixando que este se altere ao longo do crescimento, dá origem a um maior rendimento em CCP.
- **Momento de recolha das células:** É fundamental recolher as células no início da fase estacionária, antes que a densidade de oxigénio dissolvido no meio aumente para valores mensuráveis pelo medidor de oxigénio. Pouco tempo após o fermentador ter sido inoculado com a bactéria *Ps. stutzeri*, a densidade de oxigénio dissolvido no meio começa a baixar devido ao crescimento bacteriano com a limitação no arejamento imposta pela taxa de 0.2 vvm. Quando o crescimento entra em fase exponencial, a quantidade de oxigénio dissolvido é tão baixa que deixa de ser mensurável. Na fase estacionária, deixa de haver um consumo tão elevado de oxigénio por parte das bactérias e a quantidade de oxigénio dissolvido começa a aumentar. A recolha das células nesta fase levou a um rendimento tão baixo em CCP que mais uma vez a quantidade de proteína existente não foi suficiente para se conseguir levar a purificação até ao fim.

Optimizadas as condições, cresceu-se a bactéria *Ps. stutzeri* ATCC 11607 num fermentador com capacidade para 30 litros de meio de cultura. As condições usadas, encontram-se no Apêndice A. O rendimento celular obtido (em peso húmido) foi de 6



gramas de células por litro. Na figura I.2.5. encontra-se a respectiva curva de crescimento evidenciando a percentagem de oxigénio dissolvido ao longo do crescimento.



**Figura I.2.5.** Curva de crescimento de *Ps. stutzeri* num fermentador com 30 litros de meio de cultura, em que: (•) -  $\ln(X/X_0)$  ( $X$  representa a densidade óptica medida a 625 nm em cada tempo e  $X_0$  a densidade óptica ao tempo zero) e (x) -  $DO_2$ , é a percentagem de oxigénio dissolvido indicada pelo medidor de oxigénio. As células foram recolhidas 22 horas e meia após inoculação do fermentador.

### 3. Purificação da Peroxidase do Citocromo c

A membrana citoplasmática é uma estrutura fina que rodeia completamente as células, separando o interior do exterior. Nas bactérias, a elevada concentração de substâncias dissolvidas no interior, faz com que se crie uma pressão osmótica que se estima ser aproximadamente a mesma de um pneu de um automóvel. Para suportar tal pressão, as bactérias possuem, exteriormente à membrana citoplasmática, uma outra barreira denominada parede celular, a qual também dá forma e rigidez à célula. Nas bactérias Gram negativas existe um espaço entre a superfície externa da membrana citoplasmática e a superfície interna da parede celular, a que se chama periplasma [13]. Muitas enzimas e citocromos estão presentes neste espaço periplasmático, como é o caso da CCP e do citocromo  $c_{551}$  de *Ps. stutzeri*.

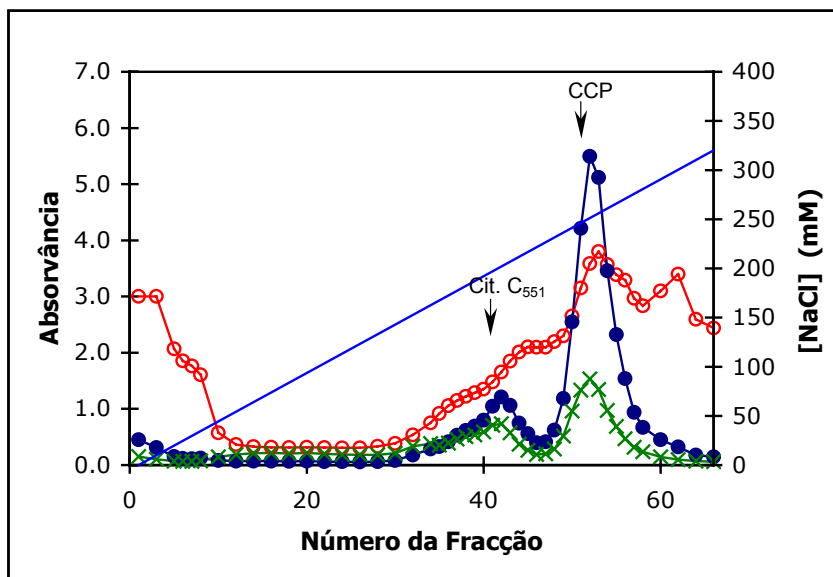
A purificação destas duas proteínas fica bastante simplificada se rompermos a parede celular por acção da lisozima na presença de EDTA, libertando selectivamente o conteúdo do periplasma da célula e mantendo o citoplasma envolvido na membrana celular intacta, isto é, se produzirmos esferoplastos. O protocolo usado para a preparação de esferoplastos a partir de células de *Ps. stutzeri* encontra-se descrito no Apêndice B.

Após a recolha das células do fermentador por centrifugação, estas são lavadas com tampão 10 mM fosfato de sódio, pH=7, e novamente centrifugadas. O passo seguinte é a formação de esferoplastos. Ao sobrenadante assim obtido adicionam-se inibidores de proteólise (1 mM PMSF e 10 mM benzamidina). As etapas seguintes da purificação são realizadas em contínuo, a 4°C e pH=8, excepto quando mencionado em contrário. O congelamento das fracções intermediárias é de evitar, pois pode levar à proteólise da CCP.

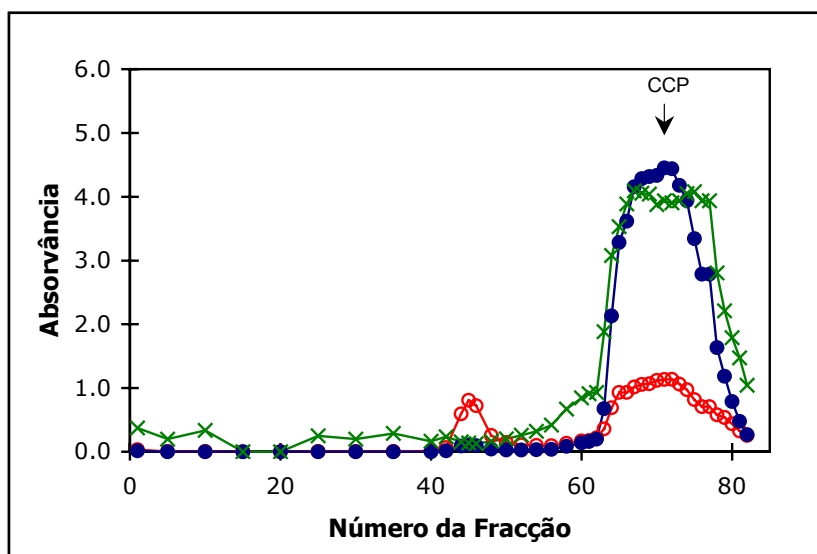
O conteúdo periplasmático é aplicado numa coluna DEAE-52 (*Whatman* 4.5×25 cm) previamente equilibrada com tampão 10 mM Tris-HCl. Após a injeção, lava-se a coluna, com o mesmo tampão com o intuito de eluir todas as proteínas não adsorvidas. Para a eluição das proteínas ácidas adsorvidas à resina, aplica-se um gradiente linear de força iónica crescente entre 0 e 400 mM de NaCl em tampão 10 mM Tris-HCl, com um volume total de 1 litro.

Na figura I.2.6. podemos observar o perfil de eluição da coluna DEAE-52. Nas fracções 1 a 10 temos uma banda de proteínas que não se adsorveram e que estavam ainda a sair quando se aplicou o gradiente.

A CCP é eluída a aproximadamente 250 mM de NaCl. De seguida, é concentrada numa pequena coluna DEAE-52, previamente equilibrada com tampão 10 mM Tris-HCl, e eluída com 500 mM de NaCl no mesmo tampão. Esta fracção, é por sua vez aplicada numa coluna de exclusão molecular, Sephadex G 150-50 (*Amersham Biosciences*, 3×83 cm). A eluição faz-se por aplicação de um gradiente isocrático de 100 mM NaCl em tampão 20 mM Tris-HCl. O perfil de eluição desta coluna encontra-se na figura I.2.7.



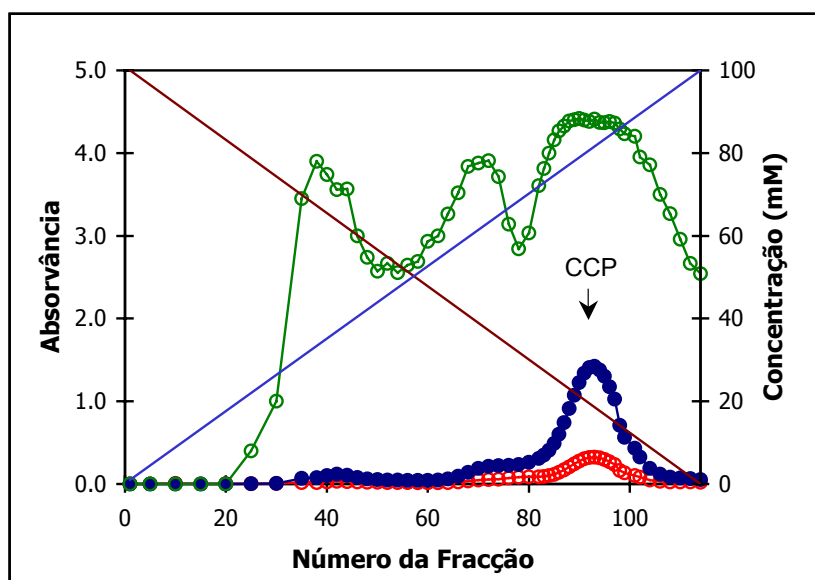
**Figura I.2.6.** Perfil de eluição da coluna DEAE-52 com um gradiente de 0 a 400 mM de NaCl. Mediram-se as absorvâncias a 280 (○) e 410 nm (●) para verificar o conteúdo de cada fracção em proteína total e citocromos, respectivamente. (×) representa a razão entre as absorvâncias a 410 e 280 nm e (—) o gradiente linear de NaCl. As bandas correspondentes à CCP e ao citocromo  $c_{551}$  encontram-se assinaladas. Não se apresenta o gradiente total, até 400 mM de NaCl, pois os dados referentes às fracções posteriores à eluição da CCP não foram registados.



**Figura I.2.7.** Perfil de eluição da coluna Sephadex G 150-50 com um gradiente isocrático de 100 mM NaCl em 20 mM Tris-HCl. Mediram-se as absorvâncias a 280 (○) e 410 nm (●). (×) representa a razão entre as absorvâncias a 410 e 280 nm. A banda correspondente à CCP encontra-se assinalada.

Nesta etapa pretende-se eliminar todos os contaminantes com pesos moleculares diferentes do apresentado pela CCP. A fracção da CCP eluída desta coluna é concentrada num aparelho de ultrafiltração, no qual o líquido é forçado a sair por acção da força centrífuga, o Vivaspín-4 (*Viviscience*) equipado com uma membrana com um limite de exclusão de 10 kDa.

A fracção concentrada é aplicada numa coluna de HTP (*Bio-Rad* 3×7.5 cm) equilibrada com tampão 1 mM fosfato de sódio, pH=7, 100 mM NaCl. A eluição é feita por aplicação de um gradiente linear decrescente de NaCl de 100 mM até 0, simultaneamente a um gradiente crescente de fosfato de 1 mM até 100 mM num volume total de 700 ml. A CCP é eluída com 80 mM de fosfato de sódio e 20 mM de NaCl. A figura I.2.8. mostra o perfil de eluição desta coluna.

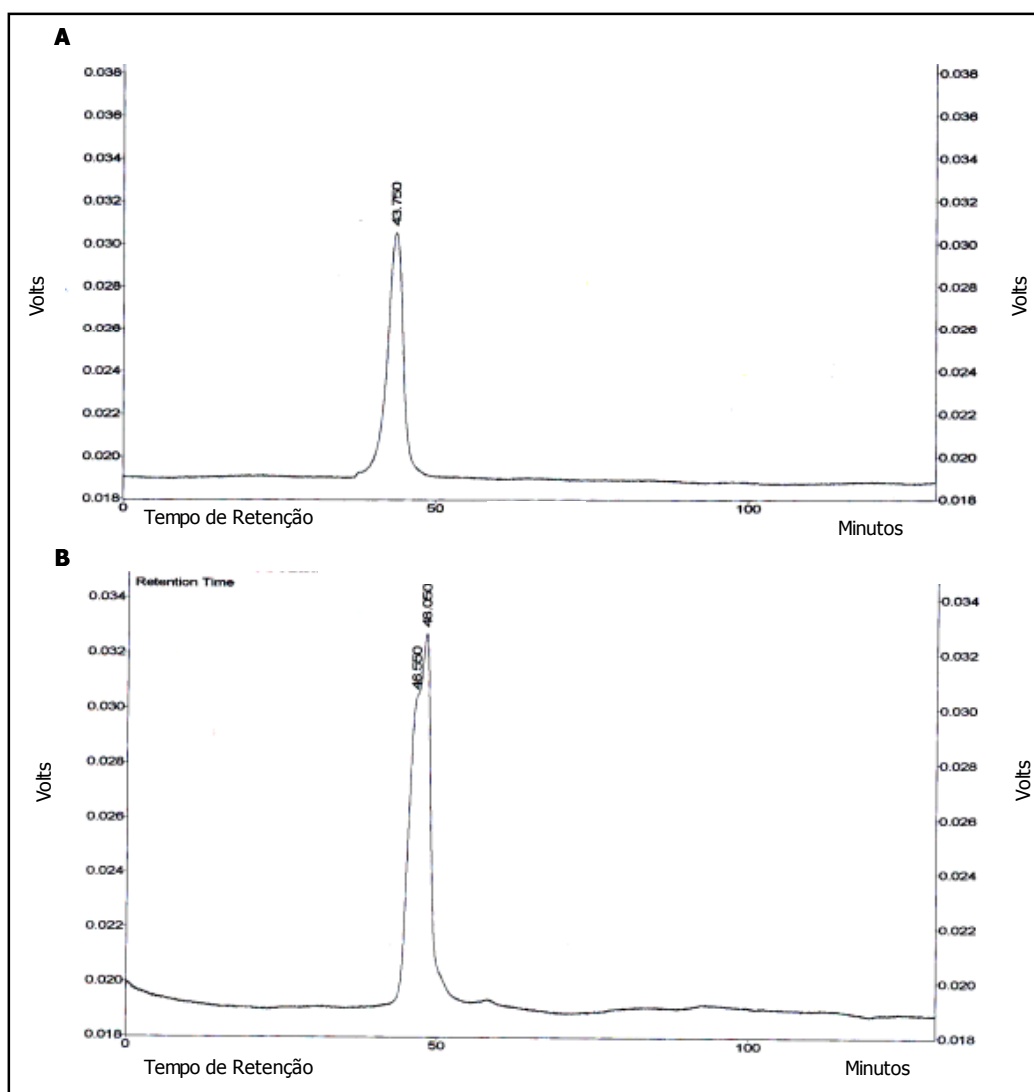


**Figura I.2.8.** Perfil de eluição da coluna HTP com um gradiente decrescente em NaCl, simultaneamente a um gradiente crescente em fosfato. Mediram-se as absorvâncias a 280 (○) e 410 nm (●). (○) representa a razão entre as absorvâncias a 410 e 280 nm, (—) o gradiente linear crescente de fosfato e (—) o gradiente linear decrescente de NaCl. A banda correspondente à CCP encontra-se assinalada.

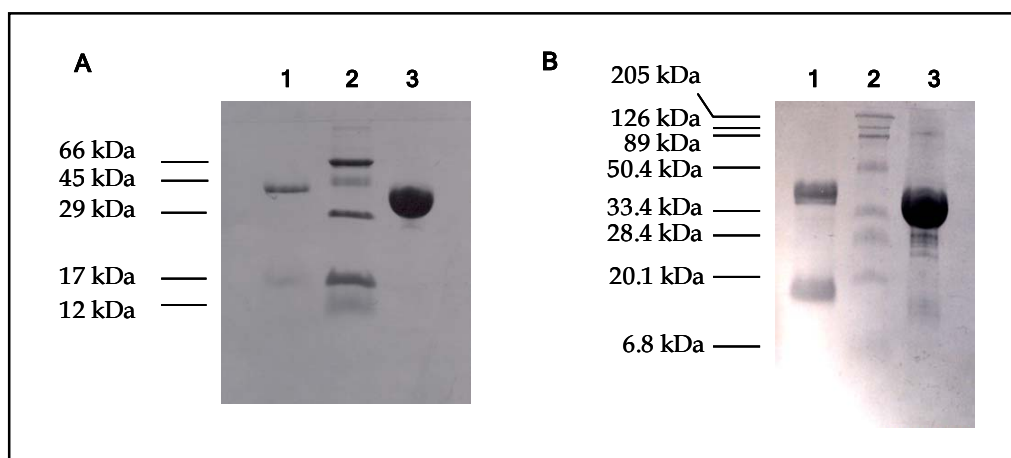
A fracção de CCP pura, à saída da HTP, apresenta uma razão de pureza  $A_{410}/A_{280}$  de 4.4. Esta amostra deu origem a uma única banda em géis de poliacrilamida em condições desnaturantes corados para hemoss ou com azul brilhante de *coomassie* (ver figura I.2.10).

A pureza da amostra foi verificada através de cromatografia de troca aniônica numa coluna Phenomenex Biosep DEAE-p. O perfil de eluição desta coluna teve como resultado um padrão complexo (ver figura I.2.9.A) que apenas foi simplificado num pico único pela inclusão de cálcio no tampão de eluição (ver figura I.2.9.B).

Por fim, a CCP é concentrada novamente num Vivaspin-4 equipado com uma membrana de 10 kDa de limite de exclusão molecular e o tampão é trocado para 10 mM HEPES, pH=7.5. A proteína é alíquotada, congelada em azoto líquido e guardada a  $-70^{\circ}\text{C}$ .



**Figura I.2.9.** Perfil de eluição da coluna Biosep DEAE-p com um gradiente de 0 a 400 mM de NaCl, em tampão 20 mM Tris-HCl, pH=8. Mediram-se as absorvâncias a 280 e 410 nm, mas apenas se apresenta a absorvância a 410 nm. **A.** Perfil na presença de 1 mM  $\text{CaCl}_2$ , **B.** Eluição sem cálcio.



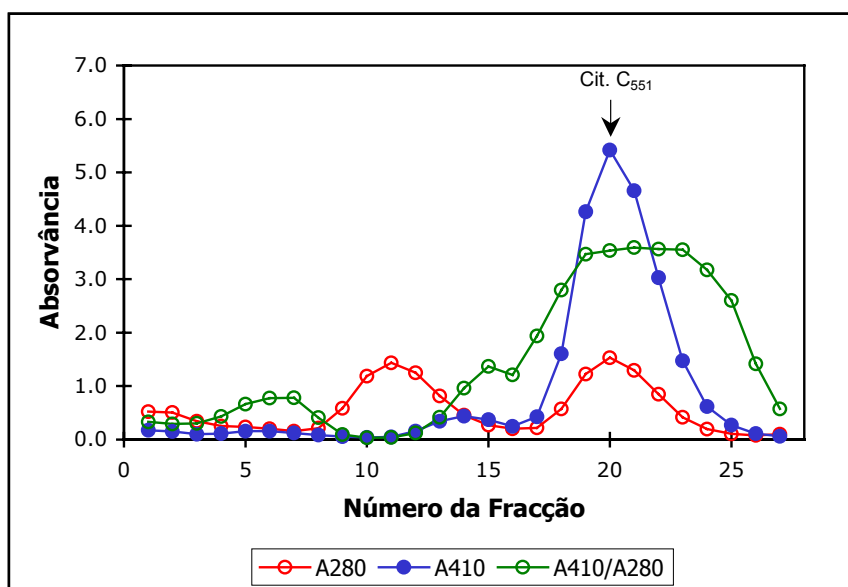
**Figura I.2.10.** Electroforese em gel de poliacrilamida (15%) na presença de SDS (0.1%). **A.** Corado com azul de coomassie; **B.** Corado para hemos de acordo com o Apêndice B. Poços: **1.** Mistura de CCP (37.5 kDa) e Citocromo  $c_{550}$  de *Pa. denitrificans* (15 kDa); **2.** Padrão de pesos moleculares (a massa molecular correspondente a cada proteína da mistura padrão encontra-se indicada à esquerda do gel) ; **3.** CCP de *Ps. stutzeri* pura.

#### 4. Purificação do Citocromo $c_{551}$

O citocromo  $c_{551}$ , tal como a CCP, é uma proteína periplásmica. Assim, os primeiros passos das duas purificações são comuns.

Na figura I.2.6. podemos observar da coluna DEAE-52 (o primeiro passo de cromatografia usado na purificação da CCP de *Ps.stutzeri* ATCC 11607), é eluída uma fracção contendo o citocromo  $c_{551}$  a cerca de 200 mM de NaCl. Esta fracção é, de seguida, concentrada num aparelho de ultrafiltração, Diaflo (*Amicon*), equipado com uma membrana YM 3. Os passos seguintes são efectuados em cromatografia líquida de alta pressão (HPLC). A fracção contendo o citocromo  $c_{551}$  é aplicada numa coluna de exclusão molecular, Superdex 75, equilibrada com tampão 300 mM Tris-HCl, pH=7.6. O perfil de eluição desta coluna com um gradiente isocrático de 300 mM Tris-HCl, pH=7.6, encontra-se na figura I.2.11.

A fracção contendo o citocromo  $c_{551}$  é concentrada num Diaflo, equipado com uma membrana YM 3, e dialisada através de adições sucessivas de água destilada até atingir uma força iónica de aproximadamente 10 mM em Tris-HCl. De seguida, é injectada numa coluna de troca aniónica, Q-Resource (*Amersham Biosciences*, 6ml), equilibrada com 10 mM Tris-HCl, pH=7.6. Para eluição aplica-se um gradiente de 10 a 500 mM de Tris-HCl pH=7.6.



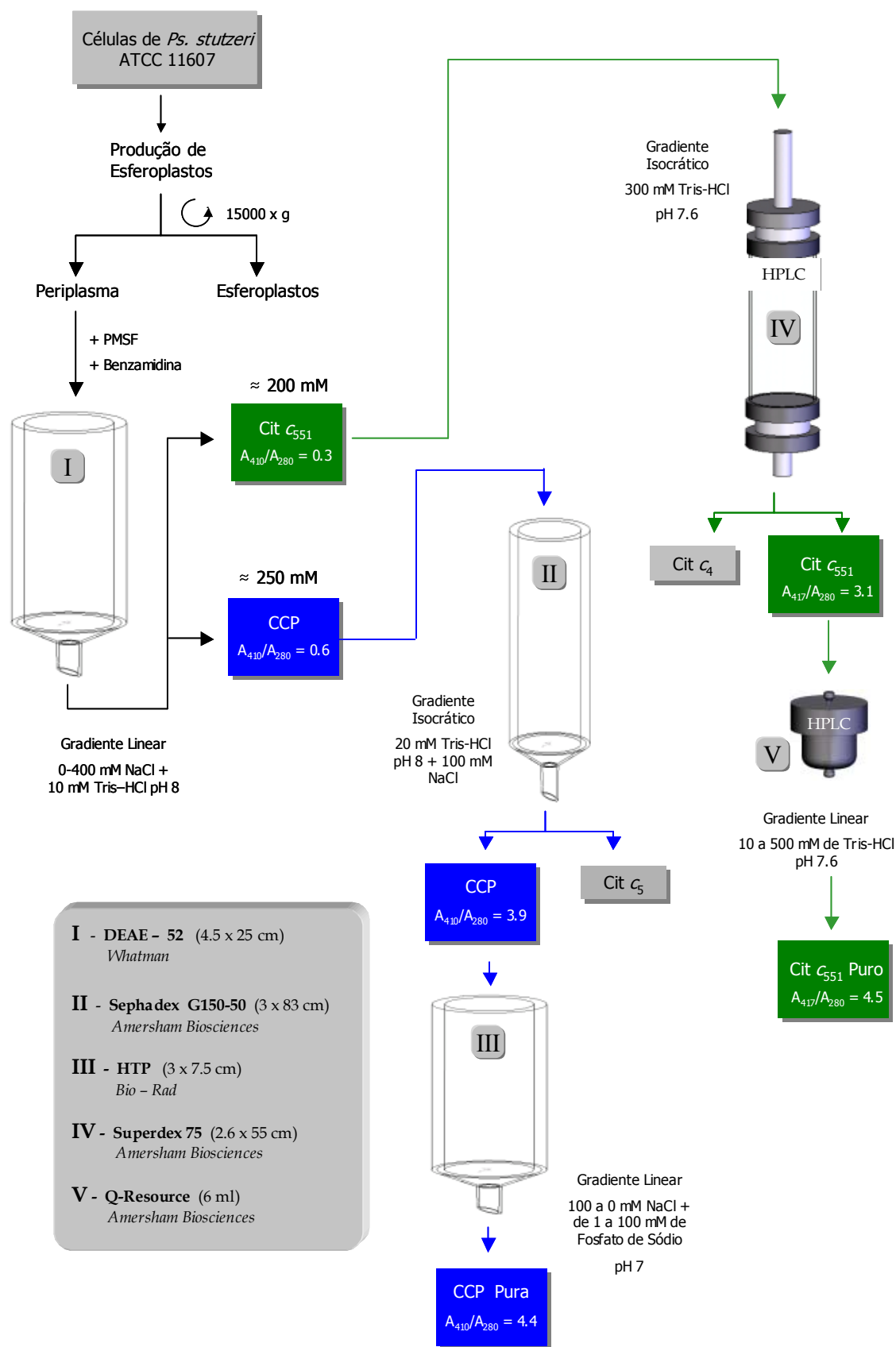
**Figura I.2.11.** Perfil de eluição da coluna Superdex 75 com um gradiente isocrático de 300 mM Tris-HCl, pH=7.6. Mediram-se as absorvâncias a 280 (○) e 410 nm (●). (○) representa a razão entre as absorvâncias a 410 e 280 nm.. A banda correspondente ao citocromo  $c_{551}$  encontra-se assinalada.

O citocromo  $c_{551}$  puro, é eluído a uma força iónica de 75 mM em Tris-HCl e apresenta uma razão  $A_{417}/A_{280}^3$  de 4.9. A pureza desta proteína é confirmada através de electroforese em gel de poliacrilamida (15 %) em condições desnaturantes e de cromatografia de filtração em gel.

Por fim, o citocromo é concentrado num Diaflo, equipado com uma membrana YM 3 e o tampão trocado para 10 mM HEPES, pH=7.5 através de adições sucessivas. É guardado congelado, a  $-70^{\circ}\text{C}$ .

Na figura I.2.12. é apresentado um esquema da purificação da CCP e do citocromo  $c_{551}$  de *Ps. stutzeri* ATCC 11607.

<sup>3</sup> O citocromo  $c_{551}$  encontrava-se na forma reduzida no final da purificação, pelo que apresentava o valor máximo de absorção da sua banda de Soret a 417 nm. Assim, mediu-se a razão de pureza entre as absorvâncias a 417 nm e 280 nm.



**Figura I.2.12.** Esquema da purificação da CCP e do citocromo  $c_{551}$  de *Ps. stutzeri* ATCC 11607.



## 5. Bibliografia

1. **Stanier, R. Y., Palleroni, N. J. e Doudoroff, M.** (1966) "The aerobic pseudomonads: a taxonomic study." *J Gen Microbiol* **43**, 159-271
2. **Zumft, W. G.** (1997) "Cell biology and molecular basis of denitrification." *Microbiol Mol Biol Rev* **61**, 533-616
3. **Ginard, M., Lalucat, J., Tummmler, B. e Romling, U.** (1997) "Genome organization of *Pseudomonas stutzeri* and resulting taxonomic and evolutionary considerations." *Int J Syst Bacteriol* **47**, 132-143
4. **Fujita, M., Futai, M. e Amemura, A.** (1990) "In vivo expression of the *Pseudomonas stutzeri* maltotetraose-forming amylase gene (*amyP*)." *J Bacteriol* **172**, 1595-1599
5. **Ambler, R. P.** (1996) "The distance between bacterial species in sequence space." *J Mol Evol* **42**, 617-630
6. **Bennasar, A., Guasp, C., Tesar, M. e Lalucat, J.** (1998) "Genetic relationships among *Pseudomonas stutzeri* strains based on molecular typing methods." *J Appl Microbiol* **85**, 643-656
7. **Villalain, J., Moura, I., Liu, M. C., Payne, W. J., LeGall, J., Xavier, A. V. e Moura, J. J. G.** (1984) "NMR and electron-paramagnetic-resonance studies of a dihaem cytochrome from *Pseudomonas stutzeri* (ATCC 11607) (cytochrome c peroxidase)." *Eur J Biochem* **141**, 305-312
8. **Liu, M. Y., Liu, M. C., Payne, W. J., Peck, H. D., Jr. e LeGall, J.** (1983) "Cytochrome components of denitrifying *Pseudomonas stutzeri*." *Curr Microbiol* **9**, 87-92
9. **Leitch, F. A., Moore, G. R. e Pettigrew, G. W.** (1984) "Structural basis for the variation of pH-dependent redox potentials of *Pseudomonas* cytochromes c-551." *Biochemistry* **23**, 1831-1838
10. **Cai, M. e Timkovich, R.** (1992) "Ionization of the heme propionate substituents in pseudomonad cytochromes c-551." *FEBS* **311**, 213-216
11. **Ambler, R. P. e Wynn, M.** (1973) "The amino acid sequences of cytochromes c-551 from three species of *Pseudomonas*." *Biochem J.* **131**, 485-498

12. **Cai, M., Bradford, E. G. e Timkovich, R.** (1992) "Investigation of the solution conformation of cytochrome *c*-551 from *Pseudomonas stutzeri*." *Biochemistry* **31**, 8603-8612
13. **Brock, T. D., Madigan, M. T., Martinko, J. M. e Parker, J.** (1994) "*Biology of microorganisms*". New Jersey, Prentice-Hall, Inc.

## *CAPÍTULO 3*

---

---

# Caracterização Bioquímica e Espectroscópica

---

---

Capítulo 3 – Caracterização Bioquímica e Espectroscópica

1. Introdução .....	51
2. Caracterização Bioquímica .....	51
2.1. Determinação do Conteúdo em Ferro e Cálcio .....	51
2.2. Determinação da Massa Molecular.....	52
2.2.1. Electroforese em Gel de Poliacrilamida em Condições Desnaturantes .....	52
2.2.2. Espectrometria de Massa.....	52
2.2.3. Cromatografia de Exclusão Molecular .....	52
2.2.3.1. Equilíbrio Dímero-Monómero .....	52
2.2.3.1. Outras Formas de Agregação.....	54
2.2.3. Ultracentrifugação .....	56
3. Caracterização Espectroscópica.....	57
3.1. Espectroscopia de UV-visível .....	57
3.2. Espectroscopia de RPE.....	66
4. Estudos Cinéticos.....	69
4.1. Efeito da Concentração do Doador Electrónico .....	69
4.2. Efeito da Concentração do Peróxido de Hidrogénio .....	70
4.3. Efeito da Semi-redução e Incubação com Cálcio.....	71
4.4. Tratamento com EGTA .....	73
4.5. Efeito da Força Iónica.....	75
5. Bibliografia .....	78

## 1. Introdução

Neste capítulo, será descrita a caracterização da CCP de *Ps. stutzeri* ATCC 11607 tanto a nível bioquímico, passando pela composição em subunidades, estudos enzimáticos e activação, como a nível espectroscópico, através das espectroscopias de UV/visível e RPE. O objectivo principal, será elucidar o papel do cálcio nesta proteína, mantendo sempre como base de comparação a CCP de *Pa. denitrificans*.

## 2. Caracterização Bioquímica

### 2.1. Determinação do Conteúdo em Ferro e Cálcio

Resultados de estudos preliminares realizados por Villalain *et al.*[1] com a CCP de *Ps. stutzeri* indicaram a presença de dois hemos do tipo c por monómero. A análise do conteúdo em ferro hémico através do método de piridina-hemocromo (ver Apêndice B) confirmou estes resultados. Obtém-se um valor igual a  $2 \pm 0.1$  hemos por monómero de CCP.

A espectroscopia de emissão atômica por plasma induzido (ICP) indicou que, para além do ferro, as amostras continham cálcio. O conteúdo deste último elemento em cada preparação encontra-se na tabela I.3.1.

**Tabela I.3.1.** Resultados da análise de cálcio por Espectroscopia de Emissão de Plasma.

Amostra	Ca <sup>2+</sup> /dímero
I	1.523
II	1.567
III	1.542

As quantificações de ferro realizadas através esta técnica, permitiram calcular o coeficiente de extinção molar para a CCP de *Ps. stutzeri*, assumindo a existência de dois hemos por monómero. O valor obtido foi confirmando por quantificações de proteína através do método de BCA (ver apêndice B).

O valor determinado para o coeficiente de extinção molar ao comprimento de onda da banda do Soret, 408 nm, foi de  $252\,000\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ .

## 2.2. Determinação da Massa Molecular

### 2.2.1. Electroforese em Gel de Poliacrilamida em Condições Desnaturantes

A electroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes permite-nos verificar o número de subunidades diferentes que compõem a proteína, bem como a sua massa molecular aparente. Verificou-se a presença de apenas uma banda, num gel de 15% de poliacrilamida na presença de 0.1% SDS, com uma massa molecular de aproximadamente 37 kDa (ver figura I.2.10, do Capítulo 2). Assim, à semelhança das restantes CCP's bacterianas [2-5], a CCP de *Ps. stutzeri* é constituída por apenas um tipo de subunidade.

### 2.2.2. Espectrometria de Massa

Da análise da CCP de *Ps. stutzeri* por Espectrometria de Massa, obteve-se um peso molecular de  $(36\,248.5 \pm 8.5)$  Da. Este valor é bastante semelhante aos dos pesos moleculares das outras CCP's conhecidas, indicados na tabela I.I.2 do Capítulo 1.

### 2.2.3. Cromatografia de Exclusão Molecular

#### 2.2.3.1. Equilíbrio Dímero-Monómero

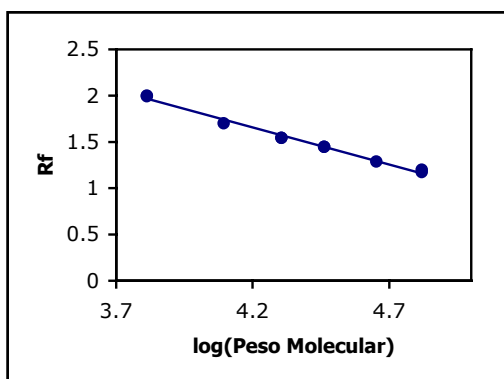
A cromatografia de exclusão molecular, não pode ser usada como uma medida muito exacta da massa molecular de proteínas que não sejam esféricas, como é o caso da CCP. No entanto, pode fornecer indicações sobre o seu estado de agregação.

No Capítulo 1 foi referido que a CCP de *Pa. denitrificans*, no seu estado nativo, se encontra num equilíbrio dímero-monómero. Este, pode ser verificado em cromatografia de exclusão molecular, se forem aplicadas na coluna diferentes concentrações da enzima. No caso da CCP de *Pa. denitrificans* são obtidas diferentes massas moleculares, dependendo da concentração aplicada [6].

A injeção da CCP de *Ps. stutzeri* numa coluna Superdex 75 (Amersham Biosciences 1×30 cm), calibrada com padrões de pesos moleculares (ver tabelas I.3.2, e I.3.3 e figura I.3.1), revelou uma massa de aproximadamente 60 kDa. Este resultado é praticamente independente da concentração de proteína.

**Tabela I.3.2.** Calibração da coluna de exclusão molecular, Superdex-75.

Padrão	Peso Molecular (Da)	Rf <sup>1</sup>
BSA	66 000	1.19
Ovalbumina	45 000	1.29
Anidrase Carbónica	29 000	1.45
Quimotripsina A	20 200	1.54
Citocromo c de cavalo	12 400	1.70
Aprotinina	6 500	2.00


**Figura I.3.1.** Recta de Calibração da Coluna de Exclusão Molecular, Superdex-75. Equação da recta:  $Rf = -0.80 \times \log(PM) + 5.01$ .

No entanto, o pico da CCP eluída desta coluna apresenta um padrão complexo, parecendo haver um arrastamento (uma “cauda”), que poderá ser devido a uma monomerização parcial ao percorrer a coluna.

Tendo em conta o peso molecular de 36.2 kDa, obtido por espectrometria de massa, no estado nativo a CCP de *Ps. stutzeri* deverá apresentar uma constituição homodimérica. A sua estrutura quaternária é do tipo  $\alpha_2$ .

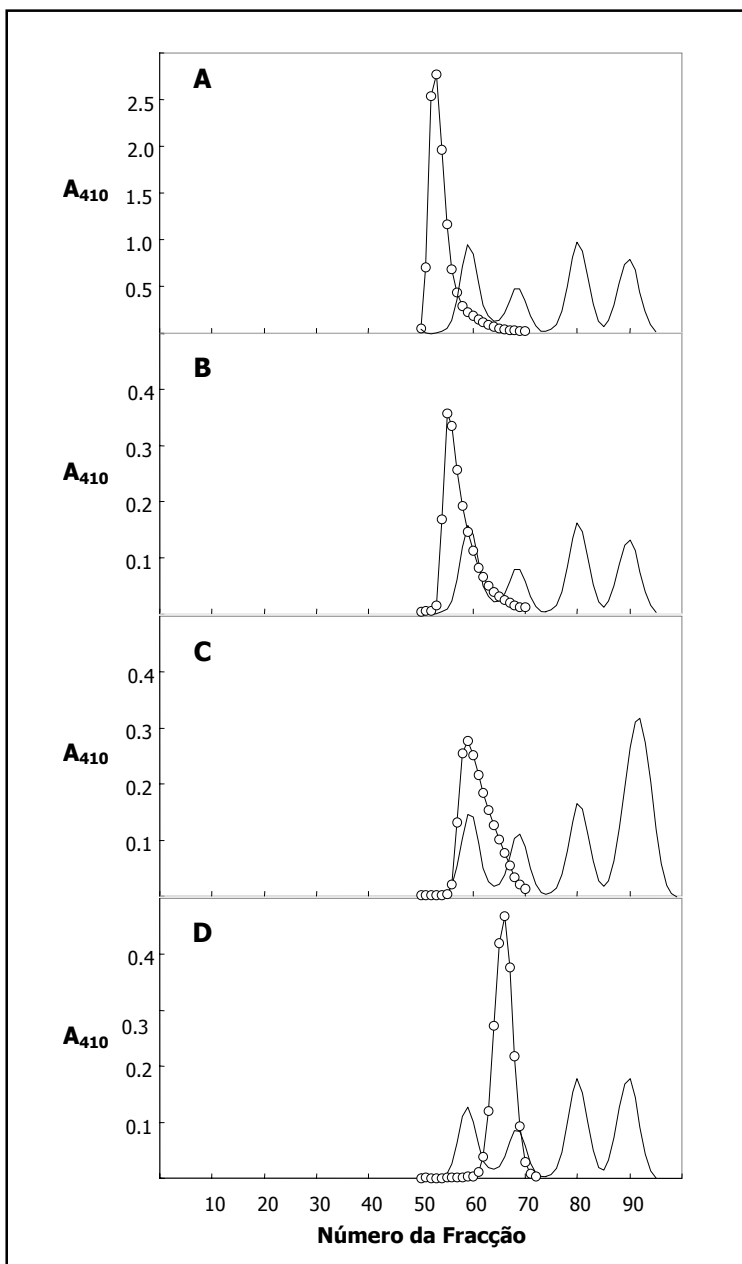
**Tabela I.3.3.** Efeito da concentração da CCP de *Ps. stutzeri* no Rf em cromatografia de exclusão molecular.

[CCP] ( $\mu$ M)	Rf <sup>1</sup>	Peso Molecular (kDa)
6	1.198	59.5
15	1.193	60.4
22	1.189	61.1

<sup>1</sup> O coeficiente de retenção, Rf, é determinado pela razão entre os tempos de retenção do pico da proteína e do pico do azul de dextrano (ver Apêndice B).

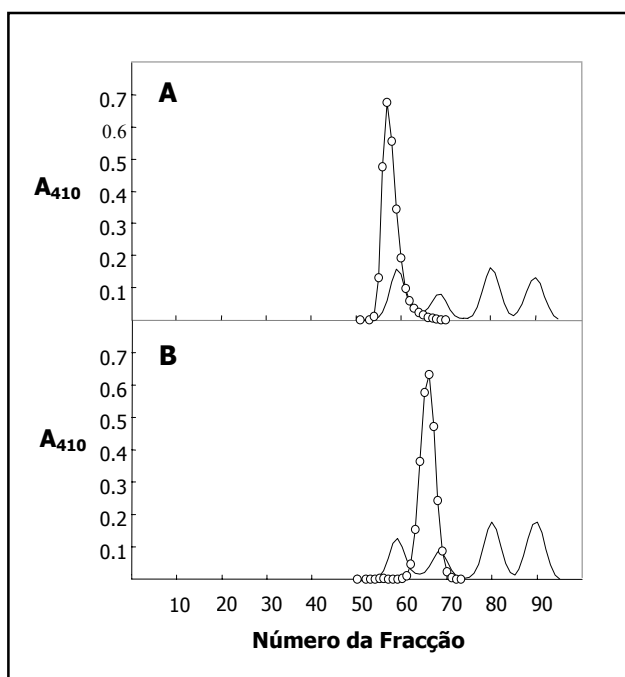
### 2.2.3.1. Outras Formas de Agregação

A injeção da CCP nativa numa outra coluna de exclusão molecular, Sephadex G150-50, originou resultados semelhantes, apenas se obtendo uma massa molecular aparente ligeiramente diferente: 67 kDa (ver tabela I.3.4. e figura I.3.2).



**Figura I.3.2.** Cromatografia de exclusão molecular da CCP de *Ps. stutzeri* na Sephadex G150-50. **A.** 175 nmol de CCP em 2 ml de tampão de eluição (ver Apêndice B), contendo 2 mM CaCl<sub>2</sub>. **B.** 30 nmol de CCP em 2 ml de tampão de eluição, contendo 2 mM CaCl<sub>2</sub>. **C.** 30 nmol de CCP em 2 ml de tampão de eluição. **D.** 30 nmol de CCP em 2 ml de tampão de eluição, contendo 1 mM EGTA.





**Figura I.3.3.** Cromatografia de exclusão molecular da CCP de *Pa. denitrificans* - Sephadex G150-50. **A.** 30 nmol de CCP em 2 ml de tampão de eluição, contendo 2 mM  $\text{CaCl}_2$ . **B.** 30 nmol de CCP em 2 ml de tampão de eluição, contendo 1 mM EGTA.

A adição de EGTA a uma enzima tem como intuito quelar todo o cálcio que esta possa possuir ligado.

Se na coluna Sephadex G150-50 se adicionar EGTA ao tampão de eluição, a massa molecular aparente obtida para a CCP de *Ps. stutzeri* é de 51 kDa. De acordo com o modelo proposto para a CCP de *Pa. denitrificans* [7], na ausência de cálcio, a enzima encontra-se numa forma monomérica. Assim sendo, a massa de 51 kDa deverá reflectir o estado monomérico da CCP de *Ps. stutzeri*. A discrepância entre este valor e a massa obtida por espectrometria de massa, será muito provavelmente devida à forma alongada do

monómero de CCP, que faz com que esta seja eluída da coluna com um tempo de retenção inferior ao esperado. O valor da massa molecular aparente da CCP de *Pa. denitrificans* determinado nestas mesmas condições foi idêntico (ver tabela I.3.4. e figura I.3.3.).

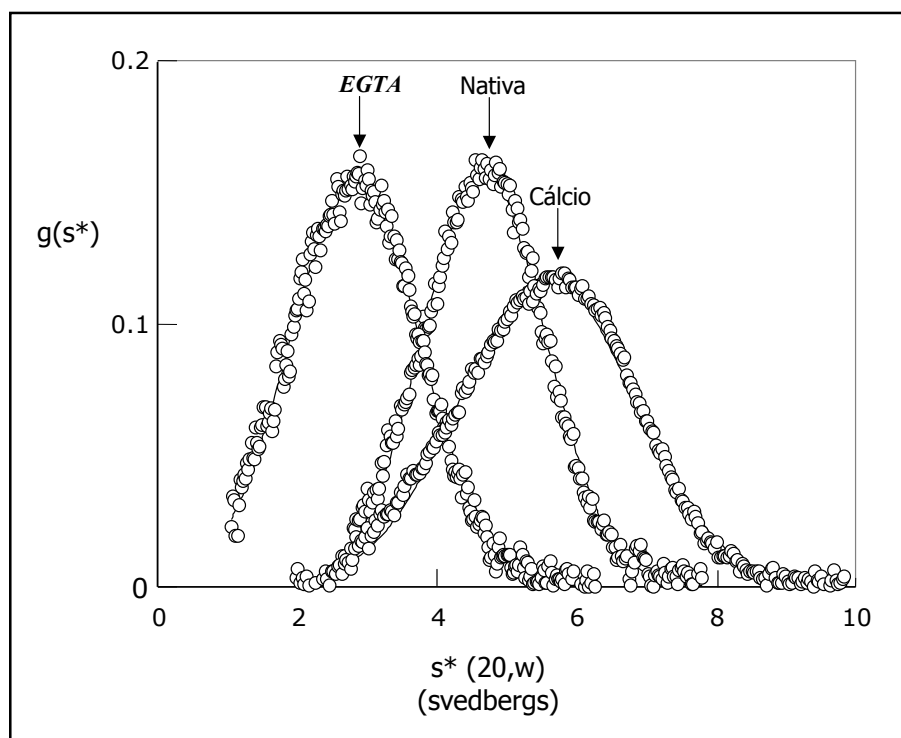
**Tabela I.3.4.** Cromatografia de exclusão molecular das CCP's de *Ps. stutzeri* e *Pa. denitrificans* na coluna Sephadex G150-50. Eluição com um gradiente isocrático de 20 mM Tris-HCl pH=8, 100 mM NaCl. Nos casos especificados na tabela adicionou-se EGTA ou cálcio ao tampão de eluição.

Condições de Eluição	Peso Molecular (kDa)	
	CCP <i>Ps. stutzeri</i>	CCP <i>Pa. denitrificans</i> [8]
Nativa	67	—
Com EGTA 1 mM	51	51
Com $\text{CaCl}_2$ 2 mM	80-87	74

A presença de cálcio no tampão de eluição, faz com que massa molecular aparente obtida para a CCP seja mais elevada, cerca de 80-87 kDa (ver figura I.3.2), o que deverá corresponder a outras formas de agregação. Isto não acontece com a CCP de *Pa. denitrificans*, a qual nestas mesmas condições apresenta uma massa molecular aparente de 74 kDa, valor coincidente com o previsto para o dímero (figura I.3.3).

### 2.2.3. Ultracentrifugação

Os perfis de velocidade de sedimentação da CCP de *Ps. stutzeri* foram analisados segundo o método de DCDT+ (ver Apêndice B), obtendo-se as distribuições gaussianas de coeficientes de sedimentação apresentadas na figura I.3.4. Na tabela I.3.5 são apresentados os valores dos coeficientes de sedimentação obtidos para a CCP de *Ps. stutzeri*, em comparação com os valores recentemente publicados para a CCP de *Pa. denitrificans* [9].



**Figura I.3.4.** Distribuição gaussiana de coeficientes de sedimentação dos resultados de ultracentrifugação da CCP nativa na presença de 1 mM EGTA e na presença de 2 mM  $\text{CaCl}_2$ .

**Tabela I.3.5.** Coeficientes de sedimentação,  $s_{20,w}$ , para as CCP's de *Ps. stutzeri* e *Pa. denitrificans* em diferentes condições experimentais.

Condições Experimentais	Coeficiente de sedimentação, $s_{20,w}$ (Svedbergs)	
	CCP <i>Ps. stutzeri</i>	CCP <i>Pa. denitrificans</i> [9]
Nativa	4.67	2.69
Com EGTA 1 mM	2.83	2.54
Com $\text{CaCl}_2$ 2 mM	5.58	4.78

O valor do coeficiente de sedimentação obtido para a CCP nativa de *Ps. stutzeri* é muito semelhante ao obtido para a CCP de *Pa. denitrificans* na presença de cálcio, condição que nesta enzima é reconhecidamente favorecedora da existência do dímero. Assim sendo, e tendo em conta os resultados já apresentados de cromatografia de exclusão molecular, podemos concluir que a CCP de *Ps. stutzeri* no seu estado nativo, se apresenta sob a forma de dímero, sem necessitar da adição de cálcio.

A adição de EGTA dá origem à monomerização de ambas as CCP's, o que se encontra reflectido nos valores semelhantes de coeficiente de sedimentação, consistentes com o menor peso molecular do monómero.

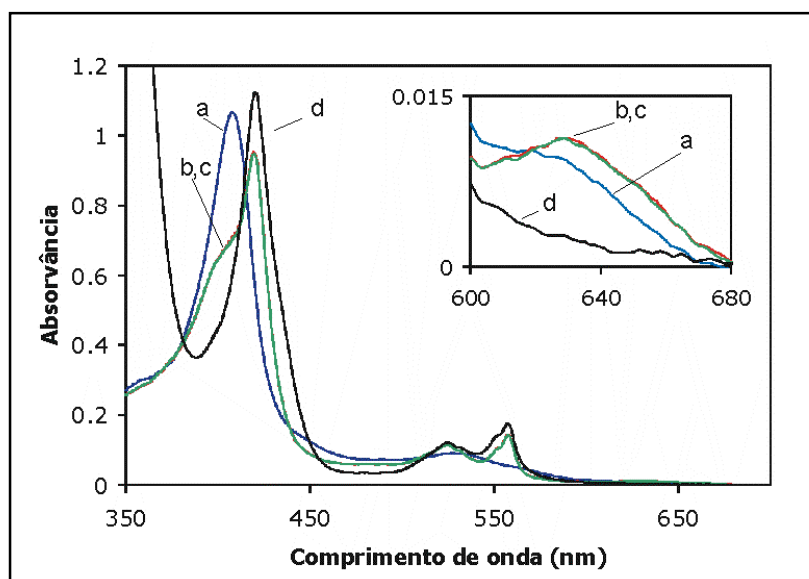
A sedimentação da CCP de *Ps. stutzeri* na presença de cálcio, revelou um resultado surpreendente, mas coerente com as observações de cromatografia de exclusão molecular. A adição de cálcio provoca um maior estado de agregação (superior ao dímero) e os resultados obtidos não podem ser explicados pela presença de uma única espécie. Este fenómeno nunca foi observado na CCP de *Pa. denitrificans*.

### 3. Caracterização Espectroscópica

#### 3.1. Espectroscopia de UV/visível

O espectro de UV/visível da CCP de *Ps. stutzeri* no seu estado nativo, apresenta um valor de absorção máximo da banda do Soret a 408 nm, uma banda a 528 nm e uma outra de fraca absorção a 630 nm (ver figura I.3.5.a e tabela I.3.6). Esta última banda é reconhecidamente indicativa da existência de um hemo em configuração de spin alto [10].

Dos estudos realizados na CCP de *Ps. aeruginosa* sabe-se que esta banda é originada pela fraca ligação da metionina ao hemo AP, o que faz com que este se encontre num equilíbrio de spins [11]. O espectro da CCP de *Ps. stutzeri* é típico de uma proteína hémica e semelhante aos espectros das restantes CCP's bacterianas.



**Figura I.3.5.** Espectros de UV/visível da CCP de *Ps. stutzeri* (4  $\mu$ M) em tampão 10 mM HEPES pH=7.5. **a)** (—) oxidada; **b)** (—) semi-reduzida; **c)** (—) semi-reduzida com 2 mM  $\text{CaCl}_2$ ; **d)** (—) reduzida com ditionito de sódio. Em inserção encontra-se uma expansão da zona da banda de spin alto a 630 nm. A enzima foi tratada da forma descrita no apêndice B.

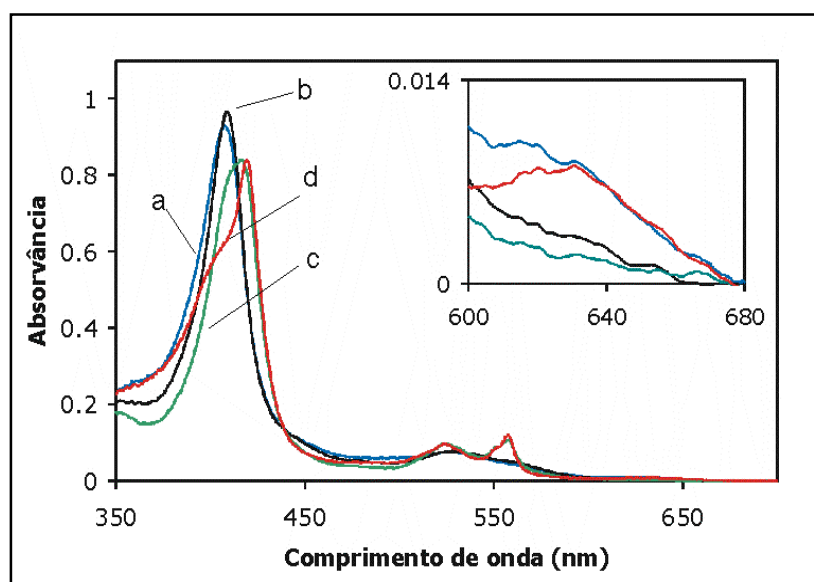
A redução do hemo AP, com ascorbato de sódio na presença de DAD (figura I.3.5.b), dá origem ao estado semi-reduzido da CCP de *Ps. stutzeri*, provocando uma alteração no máximo de absorção da banda do Soret, para maiores comprimentos de onda e o aparecimento das bandas  $\alpha$  e  $\beta$  (ver tabela I.3.6). A banda  $\alpha$  apresenta um máximo de absorção a 558 nm e um pequeno “ombro” a 553 nm, o qual também foi observado no espectro de UV/visível das restantes CCP's bacterianas [12-14]. Observa-se ainda uma banda de fraca absorção a 630 nm de aspecto diferente da observada no estado oxidado.

No espectro de UV/visível do estado semi-reduzido da CCP de *Ps. stutzeri*, a banda do Soret apresenta o “ombro” pronunciado a 400 nm, o que na CCP de *Pa. denitrificans* apenas se observa após adição de cálcio [13]. Este ombro, juntamente com a banda a 630 nm, é indicativo da existência de uma configuração de spin alto no hemo peroxidático. Assim

sendo, na forma semi-reduzida da CCP de *Ps. stutzeri*, o hemo peroxidático encontra-se pentacoordenado e pronto a ligar o  $\text{H}_2\text{O}_2$ . A enzima está na sua forma activa sem a necessidade da adição de cálcio. A adição de 2 mM  $\text{CaCl}_2$  à amostra anterior não provoca modificações no espectro de UV/visível (figura I.3.5.c).

A redução total da CCP com ditionito de sódio (figura I.3.5.d) faz com que a banda do Soret seja completamente deslocada para maiores comprimentos de onda, com um máximo de absorção a 418 nm, mas desta feita sem o “ombro” presente no espectro da forma anterior. Observa-se, também, o desaparecimento da banda a 630 nm.

Se a CCP de *Ps. stutzeri* no seu estado nativo for tratada com 1 mM EGTA, obtém-se o espectro da figura I.3.6.b. Este espectro é semelhante ao da forma nativa, com excepção da banda de spin alto a 630 nm, que deixa de ser visível.



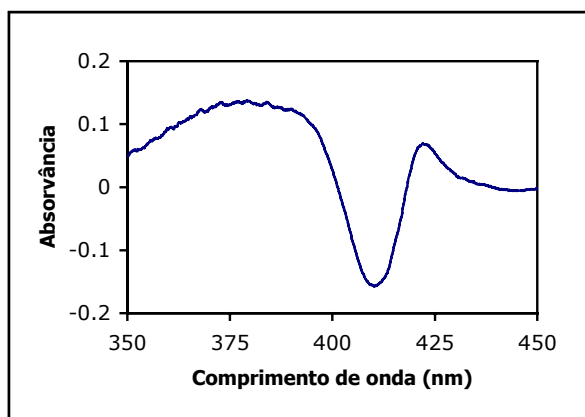
**Figura I.3.6.** Efeito da adição de EGTA no espectro de UV/visível da CCP de *Ps. stutzeri* (4  $\mu\text{M}$ ) em tampão 10 mM HEPES pH=7.5: **a)** (—) nativa; **b)** (—) enzima tratada com 1 mM EGTA; **c)** (—) semi-reduzida ascorbato de sódio e DAD na presença de EGTA; **d)** (—) adição de 3 mM  $\text{CaCl}_2$  à amostra c). Em inserção encontra-se uma expansão da zona da banda de spin alto a 630 nm.

No espectro da forma semi-reduzida da amostra previamente tratada com EGTA (figura I.3.6.c), não são visíveis as características típicas da presença de spin alto

anteriormente referidas para este estado de redução. Estas só se desenvolvem após adição de cálcio (figura I.3.6.d).

**Tabela I.3.6.** Máximos de absorção do espectro de UV-visível da CCP de *Ps. stutzeri* a pH=7.5, com e sem pré-tratamento com EGTA e em diferentes estados de oxidação. Entre parêntesis encontram-se os valores de comprimento de onda dos “ombros” existentes em algumas das bandas.

Pré-tratamento	Forma	Máximos de Absorção (nm)
Nativa	Oxidada	408, 528, 630
	Semi-reduzida	418 (408), 524 (532), 558 (553), 630
	Semi-reduzida+2 mM CaCl <sub>2</sub>	418 (408), 524 (532), 558 (553), 630
	Reduzida	418, 524 (532), 558 (553)
EGTA 1mM	Oxidada	410, 528
	Semi-reduzida	418, 524 (532), 558 (553)
	Semi-reduzida+2 mM CaCl <sub>2</sub>	418 (408), 524 (532), 558 (553), 630

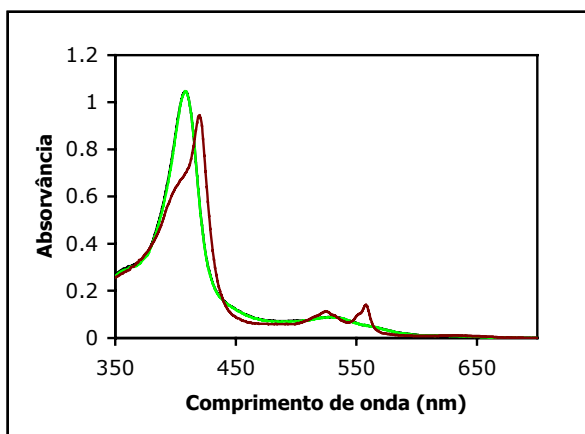


**Figura I.3.7.** Espectro de diferença entre os espectros com e sem adição de cálcio da CCP semi-reduzida pré-tratada com EGTA.

As alterações do espectro de UV/visível devidas à mudança de estado de spin de um hemo podem ser mais facilmente observadas num espectro de diferença entre as formas semi-reduzidas com e sem cálcio (figura I.3.7). Estas consistem num aumento de absorção a 380 e 422 nm com uma concomitante diminuição da absorção a 410 nm.

A CCP de *Ps. stutzeri* previamente tratada com EGTA, comporta-se de uma forma idêntica à CCP de *Pa. denitrificans* não tratada

[13]. Isto explica-se através de uma maior afinidade, na primeira CCP, do sítio de ligação ao cálcio cujo preenchimento é necessário à alteração de spin do hemo BP, e que na forma



**Figura I.3.8.** Espectros de UV/visível da CCP de *Ps. stutzeri* a pH=6. Os espectros da forma oxidada (—) e tratada com EGTA 1 mM (—) encontram-se sobrepostos. A forma semi-reduzida da CCP com EGTA (—) apresenta características de spin alto.

oxidada da CCP de *Pa. denitrificans* é de baixa afinidade (sítio II). A CCP de *Ps. stutzeri* é purificada com este sítio de ligação ao cálcio preenchido. A sua afinidade para o cálcio é tão elevada que a pH=6 não é possível destituir a proteína deste ião (ver figura I.3.8).

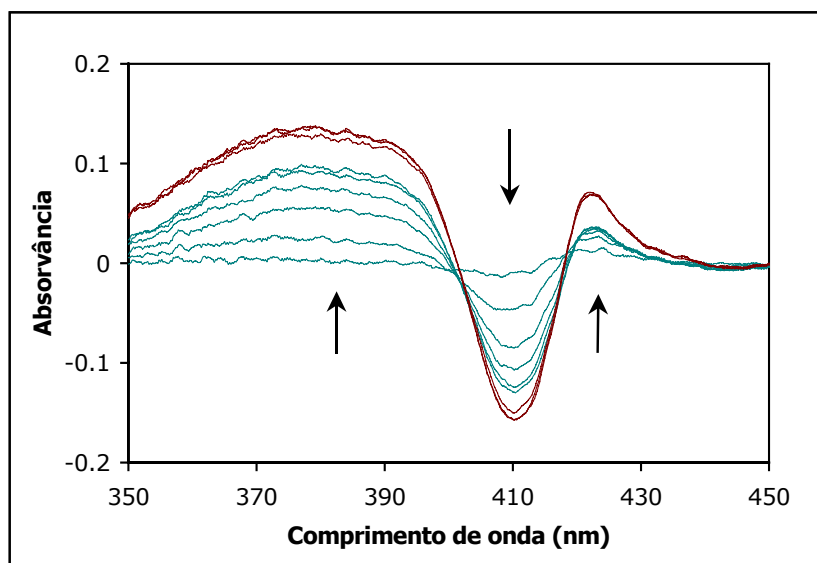
No modelo proposto para a CCP de *Pa. denitrificans* [7] a afinidade do sítio de ligação ao cálcio, cujo preenchimento é considerado essencial para a mudança de spin do hemo peroxidático, aumenta com a semi-redução da proteína. Na CCP de *Ps.*

*stutzeri* tal fenómeno também foi verificado. Na realidade, ao reduzir o hemo AP com ascorbato e DAD, a afinidade deste sítio de ligação ao cálcio aumenta de tal forma, que a enzima compete com o EGTA para o cálcio que este havia quelado.

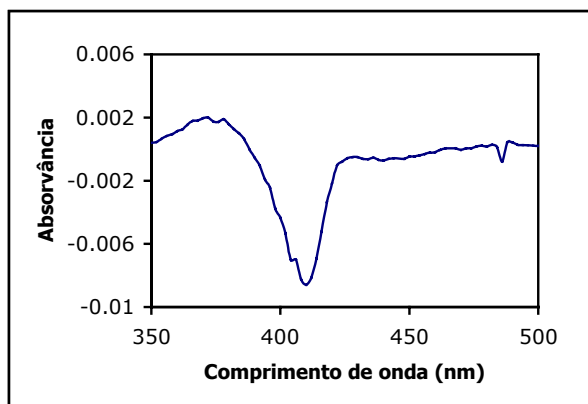
Se a CCP de *Ps. stutzeri* for tratada com EGTA na sua forma oxidada, e posteriormente for semi-reduzida, o cálcio vai retornando lentamente à enzima, ao longo do tempo de incubação. Este fenómeno encontra-se ilustrado no gráfico da figura I.3.9. No entanto, apenas cerca de 60% do total das características de spin alto são recuperadas sem a adição de  $\text{CaCl}_2$ .

No modelo proposto para a CCP de *Pa. denitrificans* existem, tal como foi referido no Capítulo 1, dois sítios de ligação para o cálcio. Na forma oxidada desta enzima, o sítio I apresenta maior afinidade que o sítio II, estando preenchido na enzima tal como foi isolada. A existência do sítio I foi verificada através de uma titulação de UV/visível com EGTA na forma oxidada da enzima. O sítio II apresenta muito baixa afinidade para o cálcio neste estado de oxidação, pelo que todas as mudanças espectroscópicas foram atribuídas ao sítio I.

A existência de dois sítios de ligação ao cálcio na CCP de *Ps. stutzeri* foi estudada através de duas formas: uma titulação com cálcio e outra com EGTA no estado oxidado da enzima.



**Figura I.3.9.** Espectros de diferença da CCP de *Ps. stutzeri* após tratamento com EGTA (na forma oxidada) com diferentes tempos de incubação (2-180 min.) e o espectro da forma semi-reduzida (1 min. de incubação) (—). As setas indicam mais tempo de incubação. Os últimos 3 espectros de diferença (—) são após adição de  $\text{CaCl}_2$  2 mM.



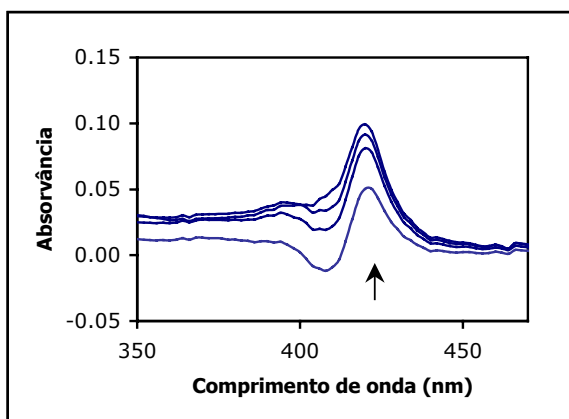
**Figura I.3.10.** Espectro de diferença da CCP de *Ps. stutzeri* a pH=7.5, entre a forma oxidada com e sem 1 mM  $\text{CaCl}_2$ .

No primeiro caso, realizaram-se sucessivas adições de cálcio à forma oxidada da CCP de *Ps. stutzeri*. As alterações ocorridas podem ser observadas no espectro de diferença do estado oxidado da CCP de *Ps. stutzeri* com e sem 1 mM de  $\text{Ca}^{2+}$  (figura I.3.10). Estas alterações não se assemelham aos resultados publicados para a entrada de cálcio no sítio I da CCP de *Pa. denitrificans* [7] e poderão reflectir apenas alguma fracção do sítio II<sup>2</sup> que não esteja totalmente preenchido.

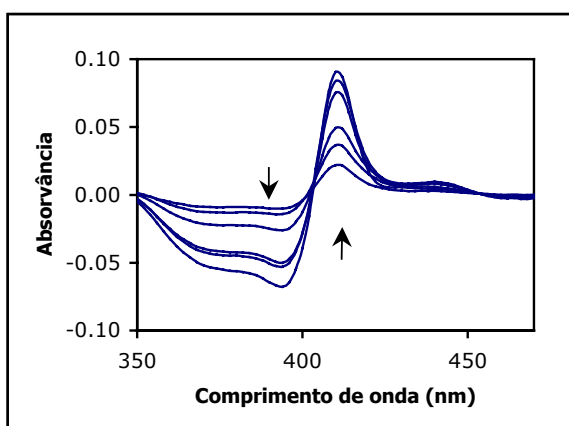
<sup>2</sup> Para simplificar a explicação, chamar-se-à ao sítio de alta afinidade da CCP de *Ps. stutzeri* sítio II, por analogia com a CCP de *Pa. denitrificans*. No entanto, a existência ou não de dois sítios de ligação ao cálcio, bem como a sua nomenclatura será abordada no Capítulo 6.



No segundo caso, fizeram-se adições sucessivas de EGTA em pequenos incrementos, até se atingir a concentração de 1 mM. Os resultados desta experiência não permitiram chegar a qualquer conclusão válida, devido ao facto de ocorrer redução parcial da proteína



**Figura I.3.11.** Espectros de diferença da CCP oxidada de *Ps. stutzeri* com concentrações crescentes de EGTA até 8  $\mu$ M e o espectro sem EGTA, a pH=7.5. As setas indicam concentrações crescentes.



**Figura I.3.12.** Espectros de diferença da CCP oxidada de *Ps. stutzeri* com concentrações crescentes de EGTA desde 12  $\mu$ M até 1 mM e o espectro com 8  $\mu$ M de EGTA, a pH=7.5. As setas indicam concentrações crescentes.

durante a incubação com EGTA.

Ao longo da titulação parecem ocorrer dois fenómenos distintos. A primeira fase, até uma concentração de 8  $\mu$ M de EGTA, pode ser explicada por uma redução parcial da enzima. Esta pode ser verificada pelo aparecimento das bandas  $\alpha$  e  $\beta$  (não visíveis na figura) e aumento de absorvância a 420 nm (ver figura I.3.11). Numa segunda fase, para concentrações superiores a 8  $\mu$ M de EGTA, as alterações espectroscópicas parecem indicar

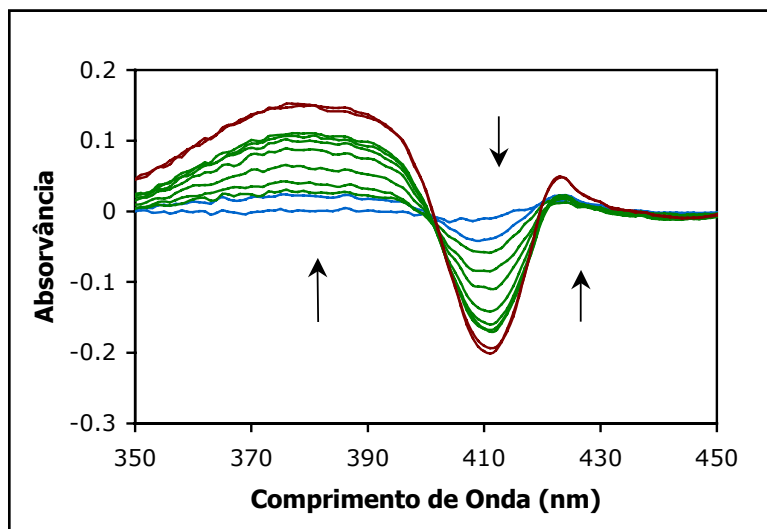
uma perda das características de spin alto de um hemo oxidado, com um aumento das características de spin baixo, traduzidas por uma diminuição da absorvância a 380 nm e aumento a 410 nm (ver figura I.3.12). Existe também nesta fase o aparecimento de uma banda a 440 nm cuja origem é desconhecida. Como a existência de redução foi consistente em todos os tratamentos prolongados com EGTA, não é possível analisar de uma forma simples estes

resultados. As diferenças espectroscópicas observadas não podem ser explicadas unicamente pela saída de cálcio do sítio de alta afinidade, nem pela existência de outro sítio de ligação do cálcio inicialmente preenchido.

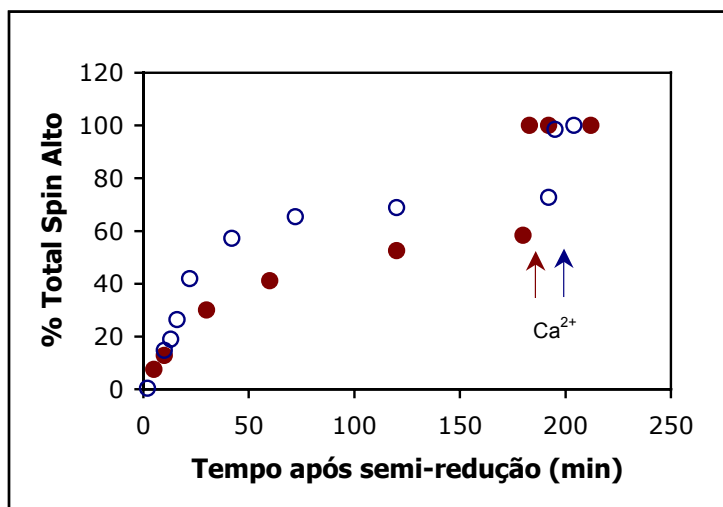
Esta poderia, no entanto, ter sido uma boa forma de verificar as diferenças espectroscópicas devidas à entrada de cálcio no sítio II na forma oxidada da CCP (isso não é possível em *Pa. denitrificans* devido à baixa afinidade deste sítio de ligação ao cálcio na forma oxidada).

Do que foi dito, pode-se concluir que na CCP de *Ps. stutzeri* existe pelo menos um sítio de ligação ao cálcio. Este apresenta elevada afinidade mesmo no estado oxidado da enzima e é o responsável pela alteração do estado de spin do hemo BP aquando da semi-redução da enzima. É portanto o análogo do sítio II da CCP de *Pa. denitrificans*. Não foi possível determinar a constante de afinidade da CCP de *Ps. stutzeri* para o cálcio, devido à complexidade das alterações espectroscópicas durante a titulação com cálcio. No entanto, no estado semi-reduzido, a constante de afinidade da CCP de *Ps. stutzeri* para o cálcio a pH=7.5 deve ser da ordem de grandeza da constante de afinidade do EGTA ( $2.6 \times 10^7$ ). A pH=6 a constante de afinidade desta CCP para o cálcio é superior à do EGTA ( $2.7 \times 10^4$ ).

Nos estudos realizados na CCP de *Pa. denitrificans*, verificou-se que o cálcio do sítio II poderia ser substituído por magnésio [7]. Para testar a entrada de magnésio no sítio de alta afinidade da CCP de *Ps. stutzeri*, tratou-se novamente a enzima, na sua forma oxidada, com 1 mM EGTA, e reduziu-se com ascorbato de sódio e DAD. Após 10 minutos de incubação, adicionou-se 2 mM  $MgCl_2$ . Os espectros de diferença entre os vários tempos de incubação com magnésio, e a enzima semi-reduzida são apresentados na figura I.3.13. Facilmente se observará a semelhança entre esta figura e a figura I.3.9. O aparecimento das características de spin alto no espectro de UV/visível após a adição de magnésio, segue sensivelmente o mesmo padrão temporal da amostra não tratada com  $Mg^{2+}$ .



**Figura I.3.13.** Espectros de diferença entre diferentes tempos de incubação após adição de magnésio e o espectro da forma semi-reduzida (1 minuto de incubação) (—) da CCP de *Ps. stutzeri* tratada com 1 mM EGTA. As setas indicam maiores tempos de incubação. Os dois primeiros espectros de diferença (—) são anteriores à adição de magnésio e os dois últimos (—) após adição de 2 mM  $\text{CaCl}_2$ .



**Figura I.3.14.** Percentagem do total das características de spin alto (verificadas através do aumento da absorvância a 380 nm) formadas ao longo do tempo de incubação após a semi-redução, com (○) e sem (●) adição de magnésio à CCP de *Ps. stutzeri*. A seta com a cor correspondente indica o momento de adição de cálcio em cada caso.

Na figura I.3.14 compara-se a percentagem do total de características de spin alto formadas ao longo do tempo de incubação na presença de magnésio, com a amostra em que não se adicionou este ião. Em ambos os casos apenas há formação da totalidade das características de spin alto após adição de  $\text{CaCl}_2$ .

Aparentemente o magnésio não substitui o cálcio no sítio de ligação de alta afinidade da CCP de *Ps. stutzeri*.

### 3.2. Espectroscopia de RPE

No espectro de RPE da CCP nativa de *Ps. stutzeri* adquirido a 8 K, são visíveis três conjuntos de sinais (figura I.3.15.A). Dois deles correspondem a hemo em configuração de spin baixo enquanto que o outro,  $g \approx 5-6$ , é típico da presença de um hemo em spin alto (ver tabela I.3.7). Este padrão é comum à maioria das CCP's bacterianas, variando apenas a intensidade do sinal de spin alto, consoante a preparação.

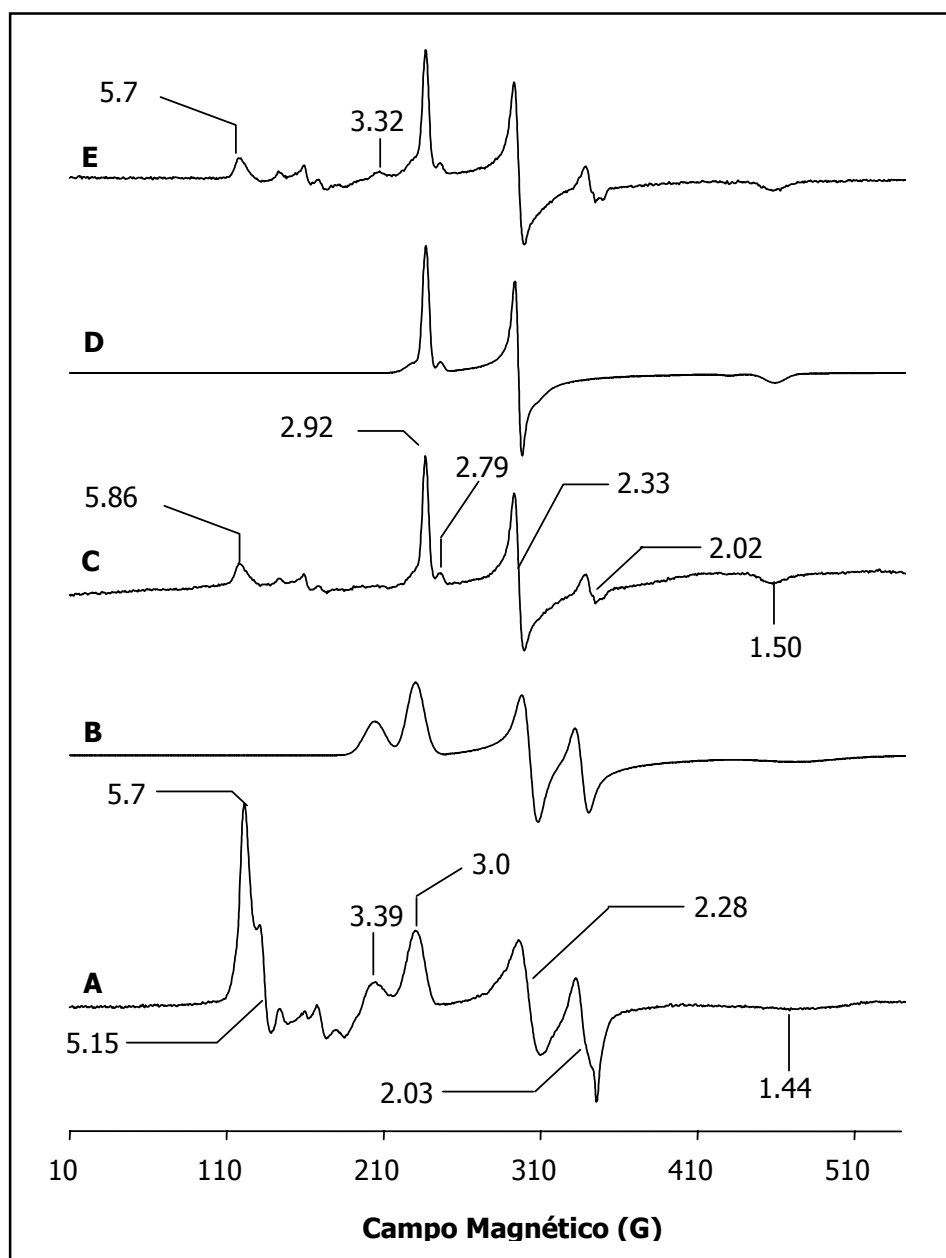
Assim, por analogia com as CCP's de *Ps. aeruginosa* e *Pa. denitrificans* [13, 15], as ressonâncias a  $g_{\text{max}}=3.00$ ,  $g_{\text{med}}=2.28$ ,  $g_{\text{min}}=1.44$  podem ser atribuídas ao hemo BP, enquanto que o conjunto de ressonâncias com um valor de  $g_{\text{max}}=3.39$  corresponde ao hemo AP.

Na forma oxidada das CCP's bacterianas, sabe-se que o hemo AP apresenta a metionina axial fracamente coordenada, encontrando-se portanto num equilíbrio de spins entre spin alto e spin baixo. Também já foi referido no Capítulo 1, que nas CCP's existe um equilíbrio de spins dependente da temperatura, que faz com que os hemo que à temperatura ambiente se encontram em configuração de spin alto, mudem para spin baixo com a descida da temperatura. O sinal de spin alto, observado no espectro de RPE da forma oxidada da CCP de *Ps. stutzeri* ( $g=5.7$  e  $g=5.15$ ) deverá corresponder a alguma fracção do hemo AP ainda em configuração de spin alto.

Os sinais fracos observados entre  $g=4.8$  e  $g=3.7$  são derivados de alguma impureza férrica.

As componentes de spin baixo existentes no espectro da forma oxidada da CCP de *Ps. stutzeri*, podem ser simuladas assumindo a contribuição de dois hemo (figura I.3.15.B).

A incubação com ascorbato de sódio e DAD (ver Apêndice B) provoca alterações profundas no espectro de RPE. Nenhum dos conjuntos de sinais observados no espectro da forma oxidada, é visível no espectro da forma semi-reduzida (figura I.3.15.C).



**Figura I.3.15.** Espectros de RPE da CCP de *Ps. stutzeri* em 10 mM HEPES, pH=7.5 (A) Forma oxidada, (C) Forma semi-reduzida e (E) Forma semi-reduzida incubada com cálcio. Condições experimentais: frequência da micro-onda, 9.65 GHz; temperatura, 8 K; número de scans, 3; ganho,  $2 \times 10^5$ ; modulação da amplitude, 5 Gpp; potência da micro-onda, 2 mW. B. é a simulação dos sinais dos hemos em spin baixo do espectro A. Os parâmetros usados na simulação do hemo BP foram:  $g_{\max}=2.99$ ,  $g_{\text{med}}=2.27$ ,  $g_{\min}=1.44$ ; e do hemo AP:  $g_{\max}=3.37$ ,  $g_{\text{med}}=2.05$ ,  $g_{\min}=0.61$ . D é a simulação das espécies de spin baixo do espectro C. Os parâmetros usados na simulação foram - espécie I:  $g_{\max}=2.91$ ,  $g_{\text{med}}=2.33$ ,  $g_{\min}=1.50$ ; espécie II:  $g_{\max}=2.80$ ,  $g_{\text{med}}=2.30$ ,  $g_{\min}=1.60$ . Como existe uma pequena contribuição de hemo AP não reduzido os parâmetros usados para simular este sinal são os mesmos da simulação B.

**Tabela I.3.7.** Valores de  $g$  das ressonâncias observadas nos espectros de RPE da CCP de *Ps. stutzeri* nas formas oxidada e semi-reduzida, com e sem adição de cálcio.

CCP	Valores de $g$	
	Hemo AP	Hemo BP
Oxidada	$g_z=3.39$	3.00, 2.28, 1.34
Semi-reduzida	—	2.92, 2.33, 1.50 (espécie I) $g_z=2.79$ (espécie II)
Semi-reduzida com 2 mM $\text{CaCl}_2$	—	2.92, 2.33, 1.50 (espécie I) $g_z=2.79$ (espécie II)

O hemo AP encontra-se na forma ferrosa, diamagnética, portanto não visível por espectroscopia de RPE. Assim, os sinais remanescentes deverão corresponder ao hemo BP. Ao contrário do observado no espectro da CCP semi-reduzida de *Pa. denitrificans*, verifica-se apenas um conjunto maioritário de ressonâncias ( $g_{\text{máx}}=2.92$ ,  $g_{\text{med}}=2.33$ ,  $g_{\text{min}}=1.50$ ). Estabelecendo um paralelo com a enzima de *Pa. denitrificans* [13, 16], estes sinais deverão corresponder à chamada espécie I. A ressonância minoritária existente a  $g=2.79$  é a única indicação da presença de uma espécie II. Estes sinais encontram-se simulados na figura I.3.15.D.

No espectro de RPE de CCP de *Pa. denitrificans* semi-reduzida, as espécies I e II apresentam intensidades comparáveis. A adição de cálcio faz com que a espécie I se torne maioritária e a espécie II quase desapareça, originando um espectro idêntico ao da CCP de *Ps. stutzeri* semi-reduzida sem adição de cálcio. A adição de cálcio a esta última enzima não provoca alterações no espectro de RPE (à exceção do aparecimento de uma pequena banda com  $g\approx 3.32$  que é devida a uma ligeira oxidação da amostra), o que é consistente com as evidências anteriores de que a CCP de *Ps. stutzeri* é purificada com o cálcio essencial às mudanças de spin do hemo BP necessárias à activação da enzima.

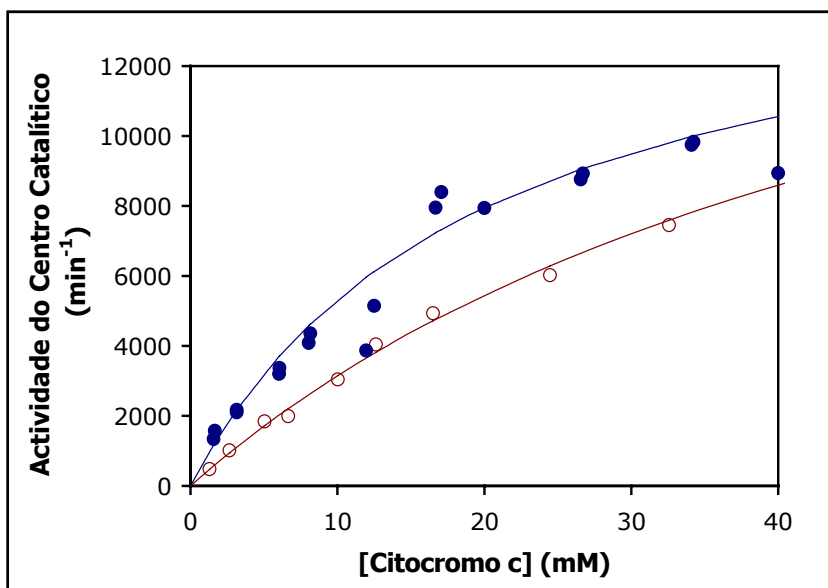
## 4. Estudos Cinéticos

### 4.1. Efeito da Concentração do Doador Electrónico

O ensaio da actividade da peroxidase do citocromo *c* foi realizado de acordo com o procedimento descrito no Apêndice D.

Para além do citocromo  $c_{551}$  de *Ps. stutzeri*, que já se sabia ser o doador electrónico fisiológico [1], também o citocromo *c* mitocondrial de coração de cavalo é oxidado pela CCP de *Ps. stutzeri*. Com ambos os doadores electrónicos, a dependência da actividade do centro catalítico em função da concentração do substrato, obedecem a uma cinética aparente de Michaelis-Menten (figura I.3.16).

Os valores obtidos para a velocidade catalítica máxima ( $V_M$ ) e para a constante de afinidade ( $K_m$ ), encontram-se na tabela I.3.8. Estes valores foram obtidos através de regressões não-lineares da equação de Michaelis-Menten, baseadas no método dos mínimos quadrados.



**Figura I.3.16.** Dependência da actividade do centro catalítico da CCP de *Ps. stutzeri* em função da concentração de doador electrónico, com o citocromo  $c_{551}$  (●) e citocromo *c* de coração de cavalo (○). Os parâmetros cinéticos foram determinados através de regressões não lineares da equação de Michaelis-Menten (curva representada a ajustar os pontos, em cada caso).

No entanto, devido às limitações do método de determinação da actividade, a gama de concentrações de citocromo  $c_{551}$  que é possível testar fica bastante aquém do elevado valor estimado para o seu  $K_m$ . Desta forma, os valores de  $K_m$  e  $V_M$  aqui apresentados para este citocromo apenas podem ser considerados como uma aproximação.

**Tabela I.3.8.** Valores dos parâmetros cinéticos da CCP de *Ps. stutzeri* com cada um dos doadores electrónicos usados, determinados através de regressões não lineares da equação de Michaelis-Menten.

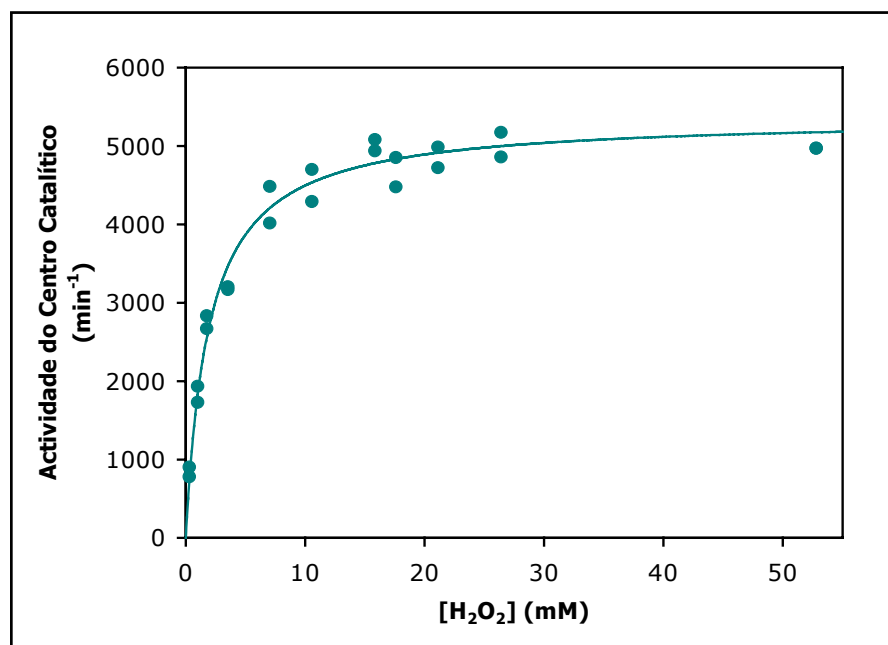
Doador Electrónico	Parâmetros Cinéticos	
	$K_m$ ( $\mu M$ )	$V_M \times 10^3$ ( $\text{min}^{-1}$ )
Citocromo $c_{551}$ de <i>Ps. stutzeri</i>	54 $\pm$ 4	20.3 $\pm$ 0.9
Citocromo $c$ de cavalo	11.8 $\pm$ 1.3	11.7 $\pm$ 0.6

## 4.2. Efeito da Concentração do Peróxido de Hidrogénio

O efeito da concentração do substrato envolvido na reacção, o  $H_2O_2$ , pode ser observado no gráfico da figura I.3.17. Os parâmetros cinéticos determinados (a uma concentração de ferrocitocromo de 7  $\mu M$ ) para este substrato foram:  $V_M = (5.3 \pm 0.1) \times 10^3 \text{ min}^{-1}$  e  $K_m = 1.8 \pm 0.05 \mu M$ .

Estes resultados demonstram que à concentração de  $H_2O_2$  a que se realizam os restantes ensaios de actividade (18  $\mu M$ ), já existe saturação neste substrato, o que valida o uso das aproximações de Gilmour *et al.* [6] de cinética de pseudo-primeira ordem.





**Figura I.3.17.** Actividade do centro catalítico da CCP de *Ps. stutzeri* em função da concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Os parâmetros cinéticos foram determinados através de uma regressão não linear da equação de Michaelis-Menten (curva representada a ajustar os pontos).

#### 4.3. Efeito da Semi-redução e Incubação com Cálcio

Se testarmos a actividade da CCP de *Ps. stutzeri* no seu estado oxidado, verificamos alguma oxidação do ferrocitocromo usado como doador electrónico, a qual aumenta de velocidade após alguns segundos de incubação. Este resultado justifica-se pela imediata transferência electrónica, e consequente activação de algumas moléculas de enzima em contacto com o ferrocitocromo, fenómeno esse que aumenta com o tempo de incubação com o doador electrónico <sup>3</sup>. No entanto, pode-se considerar que a actividade enzimática da forma oxidada da CCP de *Ps. stutzeri* é quase nula, quando comparada com o valor obtido para a forma semi-reduzida (cerca de 9%).

A redução prévia da solução "stock" CCP de *Ps. stutzeri* com ascorbato de sódio e DAD, antes da sua adição à mistura reaccional faz com que a actividade aumente de uma forma bastante acentuada (ver tabela I.3.9). No entanto a adição de cálcio a esta solução

<sup>3</sup> O ensaio de actividade foi sempre iniciado por adição da enzima. Ver no Apêndice D a descrição do ensaio de actividade da CCP de *Ps. stutzeri*.

“stock” de CCP não traz qualquer alteração à actividade da enzima. A forma activa desta CCP é, à semelhança da maioria das restantes, a forma semi-reduzida.

Até aqui, todas as diferenças de actividade ou ausência delas com as diversas pré-incubações da enzima são semelhantes para ambos os doadores electrónicos usados. No entanto, se em vez de se adicionar cálcio à solução “stock” de CCP adicionarmos 1 mM de  $\text{CaCl}_2$  à mistura reaccional, os resultados obtidos variam consoante o ferrocitocromo usado como doador electrónico (ver tabela I.3.10).

**Tabela I.3.9.** Actividades do centro catalítico da CCP de *Ps. stutzeri* com os dois doadores electrónicos usados e em diferentes estados de oxidação. O erro dos valores apresentados encontra-se entre parêntesis.

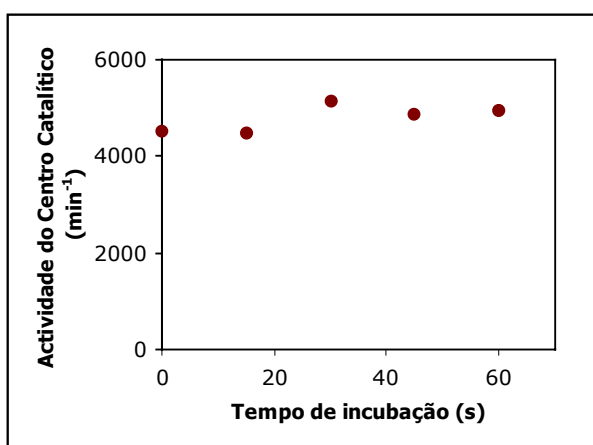
CCP	Actividade do Centro Catalítico ( $\text{min}^{-1}$ )	
	citocromo $c_{551}$ de <i>Ps. stutzeri</i>	citocromo $c$ de cavalo
Oxidada <sup>4</sup>	420 (60)	600 (100)
Semi-reduzida	4480 (400)	5940 (200)

**Tabela I.3.10.** Actividades do centro catalítico da CCP de *Ps. stutzeri* com os dois doadores electrónicos usados com e sem adição de cálcio ao “stock” da enzima ou à mistura reaccional. O erro dos valores apresentados encontra-se entre parêntesis.

CCP “stock”	Actividade do Centro Catalítico ( $\text{min}^{-1}$ )			
	citocromo $c_{551}$ de <i>Ps. stutzeri</i>		citocromo $c$ de cavalo	
	$\text{Ca}^{2+}$ no ensaio (1 mM)	sem $\text{Ca}^{2+}$ no ensaio	$\text{Ca}^{2+}$ no ensaio (1 mM)	sem $\text{Ca}^{2+}$ no ensaio
Semi-reduzida, incubada com $\text{Ca}^{2+}$	4600 (400)	4440 (600)	3390 (50)	5350 (340)
Semi-reduzida	4540 (60)	4480 (400)	3310 (70)	5940 (200)

<sup>4</sup> A determinação de um valor de actividade para estes ensaios é bastante dificultada pelo facto, já referido de a actividade aumentar ao longo do ensaio devido à semi-redução da enzima por incubação com o citocromo  $c$  da mistura reaccional. No entanto, tentou-se utilizar apenas os primeiros segundos do ensaio para determinação do declive.

Quando se usa como doador electrónico o citocromo  $c_{551}$  de *Ps. stutzeri*, não há alteração de actividade com a adição de cálcio à mistura reaccional. No entanto, com o citocromo *c* de cavalo como doador electrónico, a adição de 1 mM  $\text{CaCl}_2$  à mistura reaccional, provoca uma diminuição acentuada da actividade da CCP. Estes resultados indicam-nos que na CCP de *Ps. stutzeri*, a incubação com cálcio, não faz que este entre para nenhum outro local de ligação forte ao cálcio que exerça influência sobre a actividade, mas que o cálcio, provavelmente ligado à superfície da CCP de *Ps. stutzeri* de uma forma fraca, inibe a transferência electrónica entre o citocromo *c* de cavalo e a enzima.



**Figura I.3.18.** Gráfico da actividade específica da CCP de *Ps. stutzeri* em função do tempo de incubação após a semi-redução com ascorbato de sódio.

O gráfico da figura I.3.18 mostra a actividade em função do tempo de incubação após redução com ascorbato de sódio e DAD. Dos resultados de espectroscopia de UV/visível sabíamos já que a semi-redução se completa em apenas 1 minuto. Da análise da figura conclui-se que, ao contrário do que sucede com a CCP de *Pa. denitrificans* [6], a actividade da CCP de *Ps. stutzeri* não varia com o tempo de incubação.

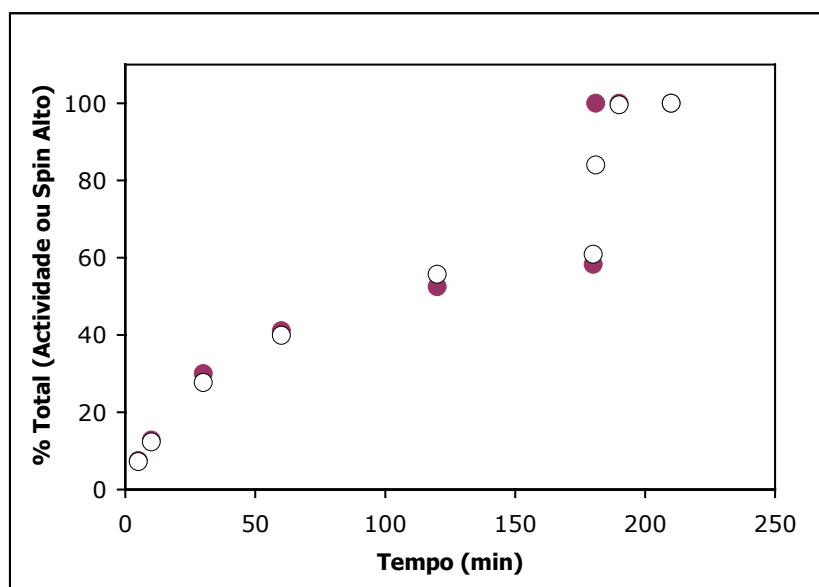
Estas observações estão de acordo com os resultados espectroscópicos e cinéticos anteriormente apresentados que nos indicam que após a semi-redução, a CCP de *Ps. stutzeri* não necessita da ligação de cálcio para se tornar activa. É de esperar que se torne totalmente activa assim que se complete a semi-redução. Na CCP da *Pa. denitrificans*, pelo contrário, existe uma activação mais lenta após semi-redução, devido à entrada de cálcio para o sítio II anteriormente vazio no estado oxidado.

#### 4.4. Tratamento com EGTA

Se a CCP de *Ps. stutzeri* no seu estado oxidado, for tratada com 1 mM de EGTA, e semi-reduzida imediatamente antes de ser adicionada à mistura reaccional, a sua actividade

catalítica é nula<sup>5</sup>. Se no entanto, se aumentar o tempo de incubação entre a redução com ascorbato de sódio e DAD e o ensaio de actividade, verifica-se um aumento da actividade da enzima idêntico à recuperação de características de spin alto observadas por espectrofotometria de UV/visível. A figura I.3.19 ilustra estes resultados, fazendo uma comparação para a mesma amostra da percentagem de características de spin alto formadas em UV/visível e aumento de actividade em relação ao total obtido após adição de cálcio<sup>6</sup>.

O tratamento com EGTA da CCP de *Ps. stutzeri* no estado semi-reduzido não provoca alteração significativa na actividade, tal como havia sido observado para as características de spin alto em espectroscopia de UV/visível. A constante de afinidade da CCP para o cálcio neste estado de redução é tão elevada que o EGTA não consegue quelar o cálcio presente na enzima.



**Figura I.3.19.** Desenvolvimento de características de spin alto (●) (medidas pelo aumento da banda de absorção a 380 nm) e aumento da actividade catalítica (○) com o tempo de incubação após a semi-redução da CCP de *Ps. stutzeri* previamente tratada com EGTA em tampão 10 mM HEPES, pH=7.5.

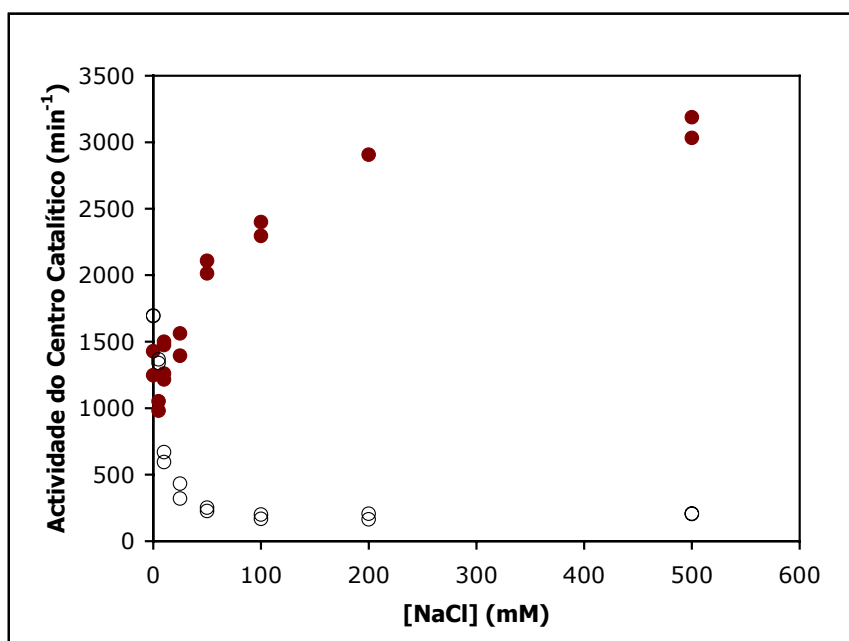
<sup>5</sup> Neste caso inclui-se 1 mM EGTA na mistura reaccional.

<sup>6</sup> No caso das formação de características de spin alto em UV/visível, esta figura contabiliza o aumento da banda de absorção a 380 nm ilustrada na figura I.3.8.

#### 4.5. Efeito da Força Iónica

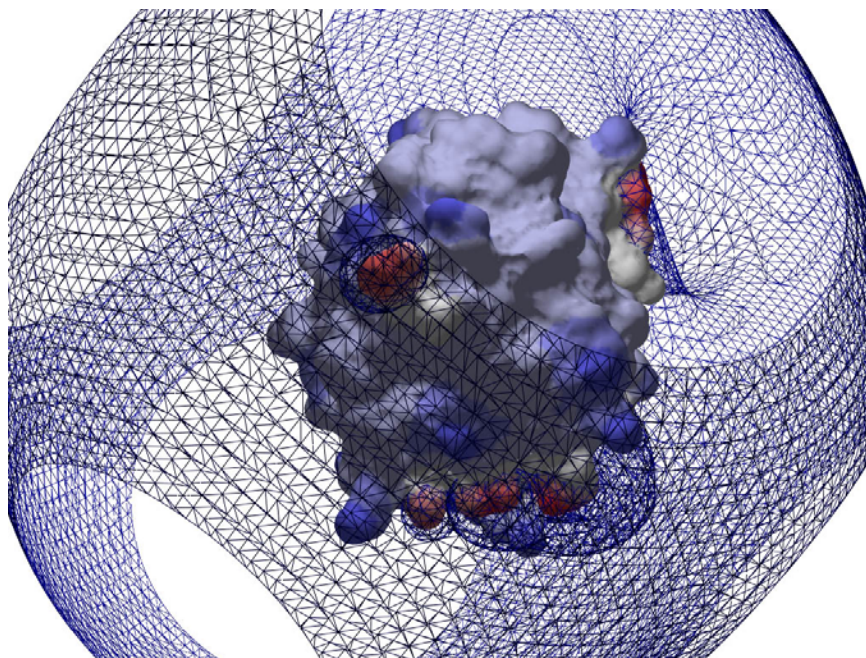
O efeito da força iónica na actividade catalítica da CCP de *Ps. stutzeri* com o citocromo  $c_{551}$  como doador electrónico foi diferente do obtido com o citocromo  $c$  de cavalo e ainda do efeito da força iónica na actividade da CCP de *Pa. denitrificans* [17].

Com o citocromo  $c_{551}$  de *Ps. stutzeri*, a actividade aumenta com a força iónica (ver figura I.3.20) até cerca de 200 mM de NaCl, valor a que se atinge um patamar. Com o citocromo  $c$  de cavalo como doador electrónico, a actividade diminui exponencialmente com o aumento da força iónica.

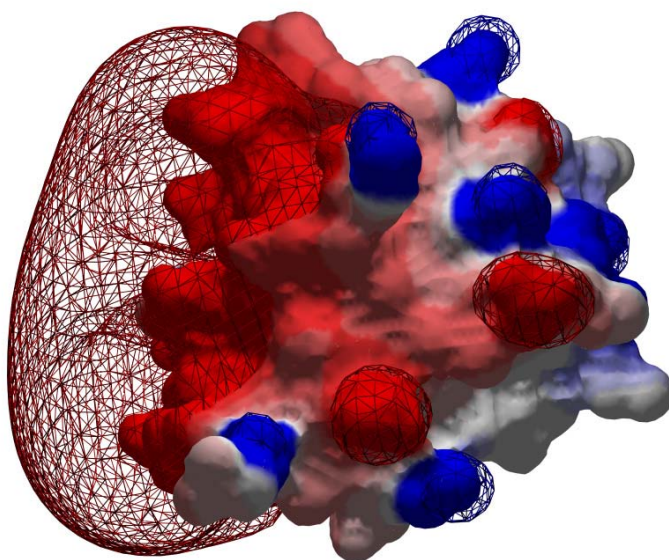


**Figura I.3.20.** Efeito da força iónica na actividade do centro catalítico da CCP de *Ps. stutzeri* a pH 7.5, com o citocromo  $c_{551}$  (●) isolado da mesma bactéria e o citocromo  $c$  de cavalo (○) como doadores electrónicos.

A curva de actividade com o citocromo  $c$  de cavalo como doador electrónico, em função da concentração de NaCl é típica da interacção entre duas superfícies de cargas opostas. Já o caso do citocromo  $c_{551}$  de *Ps. stutzeri*, parece ser um efeito de blindagem com o aumento da força iónica, o que parece reflectir a interacção de superfícies com cargas mais aproximadas [18]. Os potenciais superficiais de cada um dos citocromos apresentados nas figuras I.3.21 e I.3.22, estão de acordo com estes resultados.



**Figura I.3.21.** Representação da carga e potencial electrostático da superfície do citocromo *c* de cavalo. A cor vermelha representa resíduos carregados negativamente e cor azul resíduos carregados positivamente.



**Figura I.3.22.** Representação da carga e potencial electrostático da superfície do citocromo *c*<sub>551</sub> de *Ps. stutzeri*. A cor vermelha representa resíduos carregados negativamente e cor azul resíduos carregados positivamente.

De acordo com os resultados de “docking” da CCP de *Pa. denitrificans* [19], os doadores electrónicos interactivam com a face negativa da enzima. Assim, o citocromo c de cavalo, com um potencial fortemente positivo, tem uma carga contrária à da superfície de interacção da CCP de *Ps. stutzeri* e o aumento da força iónica faz com que haja um decaimento da actividade semelhante ao obtido no caso da CCP de *Pa. denitrificans* para concentrações de NaCl superiores a 50 mM [17].

Já o citocromo  $c_{551}$  de *Ps. stutzeri* apresenta um potencial superficial fortemente negativo de um lado da molécula e um potencial positivo não muito acentuado no lado oposto. Este último, devido à sua carga mais positiva e ao facto de o hemo se encontrar mais próximo desta superfície, deverá ser a face que interage com a CCP. O potencial fortemente negativo do lado oposto ajuda a orientar o citocromo em relação à enzima. O aumento da força iónica, neste caso exerce um efeito de blindagem em relação à presença de alguns resíduos negativos nesta face do citocromo, os quais repelem a CCP carregada negativamente.

## 5. Bibliografia

1. **Villalain, J., Moura, I., Liu, M. C., Payne, W. J., LeGall, J., Xavier, A. V. e Moura, J. J. G.** (1984) "NMR and electron-paramagnetic-resonance studies of a dihaem cytochrome from *Pseudomonas stutzeri* (ATCC 11607) (cytochrome *c* peroxidase)." *Eur J Biochem* **141**, 305-312
2. **Ronnberg, M., Kalkkinen, N. e Ellfolk, N.** (1989) "The primary structure of *Pseudomonas* cytochrome *c* peroxidase." *FEBS Lett* **250**, 175-178
3. **Pettigrew, G. W.** (1991) "The cytochrome *c* peroxidase of *Paracoccus denitrificans*." *Biochim Biophys Acta* **1058**, 25-27
4. **Arciero, D. M. e Hooper, A. B.** (1994) "A di-heme cytochrome *c* peroxidase from *Nitrosomonas europaea* catalytically active in both the oxidized and half-reduced states." *J Biol Chem* **269**, 11878-11886
5. **Hanlon, S. P., Holt, R. A. e McEwan, A. G.** (1992) "The 44-kDa *c*-type cytochrome induced in *Rodobacter capsulatus* during growth with dimethylsulphoxide as an electron acceptor is a cytochrome *c* peroxidase." *FEMS Microbiology Letters* **97**, 283-288
6. **Gilmour, R., Goodhew, C. F., Pettigrew, G. W., Prazeres, S., Moura, J. J. G. e Moura, I.** (1994) "The kinetics of the oxidation of cytochrome *c* by *Paracoccus* cytochrome *c* peroxidase." *Biochem J* **300** ( Pt 3), 907-914
7. **Gilmour, R., Prazeres, S., McGinnity, D. F., Goodhew, C. F., Moura, J. J. G., Moura, I. e Pettigrew, G. W.** (1995) "The affinity and specificity of Ca(2+)-binding sites of cytochrome-*c* peroxidase from *Paracoccus denitrificans*." *Eur J Biochem* **234**, 878-886
8. **Timoteo, C. G., Tavares, P., Goodhew, C. F., Duarte, L. C., Jumel, K., Girio, F. M., Harding, S., Pettigrew, G. W. e Moura, I.** (2003) "Ca<sup>2+</sup> and the bacterial peroxidases: the cytochrome *c* peroxidase from *Pseudomonas stutzeri*." *J Biol Inorg Chem* **8**, 29-37
9. **Pettigrew, G. W., Goodhew, C. F., Cooper, A., Nutley, M., Jumel, K. e Harding, S. E.** (2003) "The electron transfer complexes of cytochrome *c* peroxidase from *Paracoccus denitrificans*." *Biochemistry* **42**, 2046-2055
10. **Ronnberg, M. e Ellfolk, N.** (1979) "Heme-linked properties of *Pseudomonas* cytochrome *c* peroxidase. Evidence for non-equivalence of the hemes." *Biochim Biophys Acta* **581**, 325-333



11. Foote, N., Peterson, J., Gadsby, P. M., Greenwood, C. e Thomson, A. J. (1984) "A study of the oxidized form of *Pseudomonas aeruginosa* cytochrome c-551 peroxidase with the use of magnetic circular dichroism." *Biochem J* **223**, 369-378
12. Alves, T., Besson, S., Duarte, L. C., Pettigrew, G. W., Girio, F. M., Devreese, B., Vandenberghe, I., Van Beeumen, J., Fauque, G. e Moura, I. (1999) "A cytochrome c peroxidase from *Pseudomonas nautica* 617 active at high ionic strength: expression, purification and characterization." *Biochim Biophys Acta* **1434**, 248-259
13. Gilmour, R., Goodhew, C. F., Pettigrew, G. W., Prazeres, S., Moura, I. e Moura, J. J. G. (1993) "Spectroscopic characterization of cytochrome c peroxidase from *Paracoccus denitrificans*." *Biochem J* **294** ( Pt 3), 745-752
14. Ellfolk, N., Ronnberg, M., Aasa, R., Andreasson, L. E. e Vanngard, T. (1983) "Properties and function of the two hemes in *Pseudomonas* cytochrome c peroxidase." *Biochim Biophys Acta* **743**, 23-30
15. Aasa, R., Ellfolk, N., Ronnberg, M. e Vanngard, T. (1981) "Electron paramagnetic resonance studies of *Pseudomonas* cytochrome c peroxidase." *Biochim Biophys Acta* **670**, 170-175
16. Prazeres, S., Moura, J. J. G., Moura, I., Gilmour, R., Goodhew, C. F., Pettigrew, G. W., Ravi, N. e Huynh, B. H. (1995) "Mossbauer characterization of *Paracoccus denitrificans* cytochrome c peroxidase. Further evidence for redox and calcium binding-induced heme-heme interaction." *J Biol Chem* **270**, 24264-24269
17. Pettigrew, G. W., Gilmour, R., Goodhew, C. F., Hunter, D. J., Devreese, B., Van Beeumen, J., Costa, C., Prazeres, S., Krippahl, L., Palma, P. N., Moura, I. e Moura, J. J. G. (1998) "The surface-charge asymmetry and dimerisation of cytochrome c550 from *Paracoccus denitrificans*-implications for the interaction with cytochrome c peroxidase." *Eur J Biochem* **258**, 559-566
18. Tollin, G., Cheddar, G., Watkins, J. A., Meyer, T. E. e Cusanovich, M. A. (1984) "Electron transfer between flavodoxin semiquinone and c-type cytochromes: correlations between electrostatically corrected rate constants, redox potentials, and surface topologies." *Biochemistry* **23**, 6345-6349
19. Pettigrew, G. W., Prazeres, S., Costa, C., Palma, N., Krippahl, L., Moura, I. e Moura, J. J. G. (1999) "The structure of an electron transfer complex containing a cytochrome c and a peroxidase." *J Biol Chem* **274**, 11383-11389



## *CAPÍTULO 4*

---

---

### Sequenciação da Peroxidase do Citocromo *c* de *Pseudomonas stutzeri*

---

---

Capítulo 4 – Sequenciação da Peroxidase do Citocromo *c* de *Pseudomonas stutzeri*

1. Introdução .....	83
2. Sequência do N-terminal da CCP de <i>Ps. stutzeri</i> .....	83
3. Sequenciação do Gene que codifica para a CCP de <i>Ps. stutzeri</i> .....	84
3.1. Aplicação da Técnica de “ <i>Genome Walking</i> ” .....	88
3.1.1. Introdução.....	88
3.1.2. Sequenciação no sentido N-terminal .....	88
3.1.2.1. Os Iniciadores.....	88
3.1.2.2. Primeira Reacção de PCR .....	89
3.1.2.3. Segunda Reacção de PCR .....	91
3.1.2.4. Sequência Obtida .....	92
3.1.3. Sequenciação no sentido C-terminal.....	93
3.1.3.1. Os Iniciadores.....	93
3.1.3.2. Primeira Reacção de PCR .....	94
3.1.3.3. Segunda Reacção de PCR .....	95
3.1.3.4. Sequência Obtida .....	96
4. Sequência da Peroxidase do Citocromo <i>c</i> de <i>Pseudomonas stutzeri</i> .....	96
5. Bibliografia .....	100

## 1. Introdução

O conhecimento da sequência de aminoácidos de uma proteína pode ajudar a perceber determinadas diferenças de comportamento em relação a proteínas homólogas isoladas de outros organismos. No caso da CCP de *Ps. stutzeri*, é de especial interesse a zona de ligação do cálcio e as suas diferenças em relação à CCP de *Pa. denitrificans*. A sequência de aminoácidos permitiu também ajudar na resolução da estrutura tridimensional por Cristalografia de Raios-X.

Para a determinação da sequência de aminoácidos de uma proteína, duas abordagens diferentes podem ser seguidas. A abordagem clássica é a sequenciação química de fragmentos da proteína através da degradação de Edman. Para tal, torna-se necessário o corte da proteína em péptidos com diferentes enzimas proteolíticas, a sua sequenciação química e finalmente a determinação da ordem dos vários péptidos, fazendo como que a montagem de um “puzzle”.

Um outro tipo de abordagem é a sequenciação do gene que codifica para a proteína em questão. Neste caso, pode recorrer-se à comparação de sequências de proteínas homólogas e a eventuais regiões conhecidas de sequência da própria proteína para desenhar um par de oligonucleótidos iniciadores degenerados que permitam amplificar um fragmento do gene através da reacção de PCR (Reacção da polimerase em cadeia – *Polimerase Chain Reaction*). Após a obtenção de uma parte da sequência de ADN do gene pode recorrer-se à técnica de “*Genome Walking*” [1], para a qual se necessita já de iniciadores não degenerados, e que nos permite determinar a sequência de zonas do genoma adjacentes às conhecidas. Esta última, foi a abordagem seguida para a determinação da sequência da CCP de *Ps. stutzeri*.

## 2. Sequência do N-terminal da CCP de *Ps. stutzeri*

O primeiro passo para a determinação da sequência de aminoácidos da CCP de *Ps. stutzeri* foi a obtenção da sequência da região N-terminal da proteína através da degradação de Edman, num sequenciador automático (ver Apêndice B). Conseguiu-se identificar os primeiros 25 aminoácidos da proteína, à excepção do primeiro que não foi possível determinar com exactidão (ver figura I.4.1).

XELRERANAMFKPIPDKVT EVRGOK

**Figura I.4.1.** Sequência de aminoácidos da extremidade “amino” da CCP de *Ps. stutzeri*, obtida num sequenciador automático. X representa o primeiro resíduo, não identificado por esta técnica.

### 3. Sequenciação do Gene que codifica para a CCP de *Ps. stutzeri*

Para a obtenção da sequência de ADN do gene que codifica para a CCP de *Ps. stutzeri* começou-se por desenhar oligonucleótidos iniciadores para a amplificação de um fragmento desse gene através da técnica de PCR. Assim, usou-se um fragmento de sequência de aminoácidos conhecida da parte N-terminal da proteína para desenhar o iniciador degenerado PS1 com a seguinte sequência:

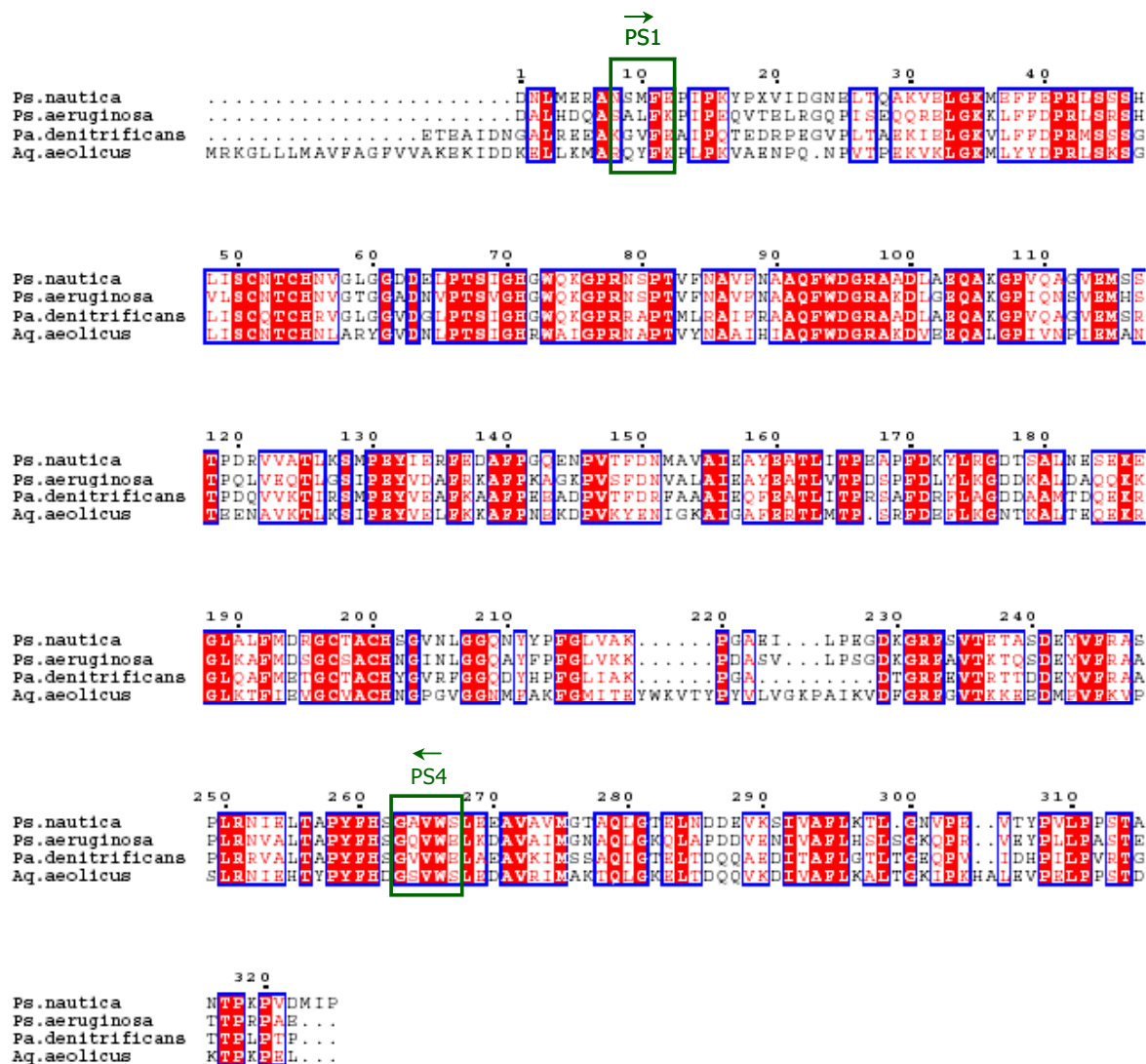
5' – qcs aac qcs atg ttc aag cc –3'

em que  $s$  representa a degenerescência  $g+c^1$ .

Para desenhar o iniciador da direcção oposta, foi necessário recorrer a uma zona bastante conservada das sequências de aminoácidos das restantes CCP's bacterianas. Esse iniciador, denominado PS4, encontra-se marcado na figura I.4.2, a qual ilustra a comparação das sequências de aminoácidos de quatro das CCP's bacterianas usadas para verificação de zonas conservadas.

Para diminuir a degenerescência dos iniciadores desenhados calculou-se a frequência dos codões que codificam para cada aminoácido noutras proteínas isoladas de *Ps. stutzeri*, cuja sequência de ADN era conhecida. Ao desenhar os iniciadores não foram considerados os codões com uma frequência de menos de 10% em todas as sequências analisadas.

<sup>1</sup> Por cima da sequência de ADN (5'→3') encontra-se a sequência de aminoácidos a partir da qual se desenhou o oligonucleótido.



**Figura I.4.2.** Comparação das sequências de aminoácidos das CCP's bacterianas isoladas de *Ps. nautica* [2], *Ps. aeruginosa* [3], *Pa. denitrificans* [4] e *Aquifex aeolicus* [5], para a verificação de zonas conservadas. As zonas onde foram desenhados os dois oligonucleótidos iniciadores para a reacção de PCR, PS1 e PS4, encontram-se marcadas com caixas de cor verde.

←

A sequência do iniciador PS4 é a seguinte:

5'- tc cca sac ctt rcc -3'

O iniciador PS4 é o complementar e inverso da sequência de ADN que codifica para a proteína. s e r são degenerescências que significam g+c e a+g, respectivamente.

Uma vez desenhado o par de iniciadores, isolou-se o ADN molde para a reacção de PCR, a partir de uma cultura da bactéria *Ps. stutzeri* (ver Apêndice C). A reacção de PCR foi preparada com 50 ng de ADN molde num volume total de 50 µl (as restantes condições da reacção encontram-se no Apêndice C) e decorreu num termociclador com o seguinte programa:

**Passo 1** – Desnaturação inicial da cadeia de ADN a 94°C, durante 5 minutos.

**Passo 2** – Desnaturação de cada ciclo a 94°C, durante 30 segundos.

**Passo 3** – Hibridação a 53°C<sup>2</sup>, durante 1 minuto e 30 segundos.

**Passo 4** – Amplificação a 72°C durante 2 minutos.

(Os passos 2 a 4 foram repetidos 35 vezes)

**Passo 5** – Amplificação final a 72°C, durante 10 minutos.

**Passo 6** – Permanência a 4°C em pausa.

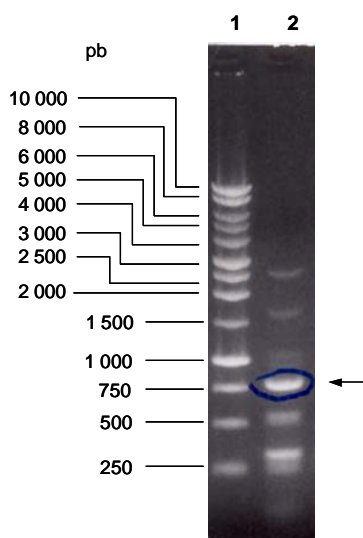
Verificou-se o resultado da reacção de PCR através de uma electroforese em gel de 1% de agarose com brometo de etídeo, cuja fotografia se encontra na figura I.4.3. Tendo em conta a comparação de sequências da figura I.4.2. o fragmento de ADN esperado deveria ter cerca de 780 pares de bases (pb), correspondendo a uma zona de 260 aminoácidos da proteína. A banda assinalada na figura I.4.3. apresenta um tamanho de aproximadamente 780 pb, pelo que foi extraída do gel e purificada para ligação ao vector pGEM-T EASY (*Promega*). O ADN ligado ao plasmídeo foi transformado em células competentes *Epicurian Coli XL1-Blue*, as quais foram crescidas em meio LB com ampicilina, X-Gal e IPTG para selecção das colónias que adquiriram o plasmídeo contendo a inserção através da sua cor branca (ver Apêndice C). Estas foram crescidas em meio líquido LB contendo ampicilina. O ADN plasmídico foi isolado e sequenciado.

As sequências de ADN e aminoácidos obtidas para a CCP de *Ps. stutzeri* a partir do fragmento da reacção de PCR com os iniciadores PS1 e PS4 encontra-se na figura I.4.4.

---

<sup>2</sup> A temperatura de emparelhamento é escolhida tendo em conta a temperatura de fusão ( $T_m$ ) de cada um dos iniciadores. Neste caso  $T_m$  do PS1=57.5°C e do PS4=47.8°C.





**Figura I.4.3.** Gel de 1% de agarose do produto da reacção de PCR com os iniciadores PS1 e PS4. **Poços:** 1. Marcador de pesos moleculares 1kB (*Promega*); 2. Produto da Reacção de PCR. A banda assinalada com uma seta apresenta um peso molecular de  $\approx 760$  pb.

```

gccaacgcgatgttcaagccgattcccgcacaaggtcaccgaggtccgcggccagaaggtc
A N A M F K P I P D K V T E V R G Q K V
agcgaagatcaggcaatgtctcggtcacaaactctggttcgacccgcgcctgtccagcagt
S E D Q A M L G H K L W F D P R L S S S
cacgtcatcagctgcaacacctgccacaacctgagcatcgggggcagcgacaacgtgcc
H V I S C N T C H N L S I G G S D N V P
acctcgatcgggtcacggctggcagaagggcccgcgcaactcgccaccgtgctgaacgcc
T S I G H G W Q K G P R N S P T V L N A
gtattcaacgcgcgcagttctgggacggacgcgccaaggatctgcaggaacaggccaag
V F N A A Q F W D G R A K D L Q E Q A K
ggcccggtccaggcaagcgtggaaatgaacagtagcccgagcgtgtcgtctcgacgctg
G P V Q A S V E M N S T P E R V V S T L
cagagcattccggagtacgcccgaggttcaagaaggccttccccaacgacaaggagccg
Q S I P E Y A A E F K K A F P N D K E P
gtcagtttcgacaacatggcctacgccctggaagccttcgaagtcagcctgaccacgccg
V S F D N M A Y A L E A F E V S L T T P
aactcgccgttcgaccgcttcctcaagggtgaggacggggcgctggacgacaagcagaaa
N S P F D R F L K G E D G A L D D K Q K
cagggtctcgccctgttcattggacgcgggtgctcttctgccacaacggcgtaacctt
Q G L A L F M D A G C S S C H N G V N L
ggtggccagggttacttcccttcggcggtgatcaagaagcccgagccgaagtgtgccc
G G Q G Y F F F G V I K K P G A E V L P
accggcgacaaggggcggttcggggtgaccaataaccgccagcgacgagtcttccgt
T G D K G R F A V T N T A S D E Y V F R
gccgcgccgtgcgcaatgtcgcggttgaccccgccgtacttccacagcggttaaggtctgg
A A P L R N V A L T P P Y F H S G K V W
gaa
E
    
```

**Figura I.4.4.** Sequência de ADN da CCP de *Ps. stutzeri* e respectivos aminoácidos por ela codificados, obtida através do fragmento amplificado pela reacção de PCR com os iniciadores PS1 e PS4 (destacados por caixas).

### 3.1. Aplicação da Técnica de “*Genome Walking*”

#### 3.1.1. Introdução

Na técnica de “*Genome Walking*” constroem-se quatro bibliotecas genómicas a partir do ADN cromossómico da bactéria cortado com diferentes enzimas de restrição (*EcoRV*, *DraI*, *PvuII* e *StuI*). Aos fragmentos resultantes liga-se um adaptador (ver Apêndice C) fornecido pelo fabricante do *kit* (*Clontech*). Realizam-se então duas reacções de PCR consecutivas, sendo utilizado, em cada uma delas, um iniciador específico para sequência de ADN do gene em estudo e outro específico para o adaptador.

A definição dos oligonucleótidos iniciadores é essencial ao sucesso desta técnica. É importante que estes não sejam degenerados, que sejam constituídos por cerca de 27 nucleótidos, e que não possuam mais de 3 bases g+c entre os últimos 6 nucleótidos. Todos estes requisitos visam aumentar a especificidade de ligação do iniciador ao ADN alvo.

Os iniciadores devem ser desenhados o mais próximo possível das extremidades da zona conhecida, de forma identificar o maior número de nucleótidos da sequência desconhecida do gene. O segundo iniciador, denominado interno, (a usar na segunda reacção de PCR) deve ser desenhado mais perto da extremidade do que o primeiro, sem que estes se sobreponham.

A realização de duas reacções de PCR tem como objectivo um maior enriquecimento no produto pretendido, já que o facto de termos um iniciador que se liga ao adaptador, presente em todos os fragmentos de ADN da biblioteca, faz com que haja possibilidade de formação de um grande número de produtos de PCR inespecíficos. No final da segunda reacção de PCR deve-se conseguir um produto maioritário em pelo menos uma das bibliotecas.

#### 3.1.2. Sequenciação no sentido N-terminal

##### 3.1.2.1. Os Iniciadores

Para determinar a sequência de ADN a montante da zona conhecida, desenharam-se dois iniciadores na cadeia complementar à codificante:

← **PS6** 5'- tgcagctgatgacgtgactgctggaca -3'  
← **PS7** 5'- gcattgcctgatcttcgctgaccttct -3'

em que os iniciadores sintetizados são complementares e inverso da sequência de ADN que codifica para a proteína.

Na figura I.4.5 é possível observar a localização destes dois iniciadores na sequência de ADN conhecida.

```

                                ←
                                PS7
gccaacgcgatgttcaagccgattcccgacaaggtcaccgaggtccgcggccagaagggtc
A N A M F K P I P D K V T E V R G Q K V
                                ←
                                PS6
agcgaagatcaggcaatgctcggtcacaaactctggttcgacccgcgcctgtccagcagt
S E D Q A M L G H K L W F D P R L S S S
cacgtcatcagctgcaacacctgccacaacctgagcatcgggggcagcgacaacgtgcc
H V I S C N T C H N L S I G G S D N V P
acctcgatcgggtcacggctggcagaagggcccgcgcaactcgcccaccgtgctgaacgcc
T S I G H G W Q K G P R N S P T V L N A
gtattcaacgcgcgcagttctgggacggacgcgccaaggatctgcaggaacaggccaag
V F N A A Q F W D G R A K D L Q E Q A K
ggcccggtccaggcaagcgtggaaatgaacagtacggcgagcgtgtcgtctcgacgtg
G P V Q A S V E M N S T P E R V V S T L
cagagcattccggagtacggcgcgagttcaagaaggccttccccaacgacaaggacgg
Q S I P E Y A A E F K K A F P N D K E P
gtcagtttcgacaacatggcctacgccttggaagccttcgaagtcagcctgaccacgccg
V S F D N M A Y A L E A F E V S L T T P
aactcgccggttcgaccgcttcctcaagggtgaggacggggcgctggacgacaagcagaaa
N S P F D R F L K G E D G A L D D K Q K
cagggtctcgccctgttcattggacgcgggctgctcttcctgccacaacggcgtcaacctt
Q G L A L F M D A G C S S C H N G V N L
ggtggcagggttacttccccttcggcggtgatcaagaagcccgagccgaagtgtcgccg
G G Q G Y F P F G V I K K P G A E V L P
accggcgacaagggcggttcgcggtgaccaataccgccagcgacgagtacgtcttcctg
T G D K G R F A V T N T A S D E Y V F R
gccgcgcccgtgcgcaatgtcgcgttgaccccgccgtacttccacagcggttaaggtctgg
A A P L R N V A L T P P Y F H S G K V W
gaa
E
    
```

**Figura I.4.5.** Localização na sequência de ADN da CCP de *Ps. stutzeri*, dos iniciadores PS6 e PS7 para a primeira e segunda reacção de PCR respectivamente, no sentido do N-terminal.

### 3.1.2.2. Primeira Reacção de PCR

Após o isolamento do ADN genómico da bactéria *Ps. stutzeri* e construção das livrarias genómicas de acordo com as especificações do fabricante do kit de “Genome Walker” (Clontech), realizou-se a primeira reacção de PCR com os iniciadores PS6 a AP1 (fornecido no kit Clontech).

A temperatura de emparelhamento escolhida para os primeiros 7 ciclos é normalmente mais alta do que nos últimos 32 com o intuito de obter um emparelhamento mais específico

no início. Passada essa fase, já existe enriquecimento no produto pretendido, e pode-se então baixar a temperatura para obter um maior rendimento da reacção de PCR.

A primeira temperatura de emparelhamento é normalmente escolhida alguns graus acima da temperatura de fusão ( $T_m$ ) do iniciador. Se no entanto, não se conseguir obter um produto de PCR nessas condições, deve baixar-se a temperatura dos primeiros ciclos. Para segunda temperatura de emparelhamento escolheu-se sempre uma temperatura 5°C abaixo da primeira.

O programa de PCR encontra-se descrito abaixo:

**Passo 1** – Desnaturação inicial da cadeia de ADN a 94°C, durante 25 segundos.

**Passo 2** – Desnaturação a 94°C, durante 25 segundos.

**Passo 3** – Hibridação e extensão a 78°C<sup>3</sup>, durante 3 minutos.

(Os passos 2 e 3 foram repetidos 7 vezes)

**Passo 4** – Desnaturação a 94°C, durante 25 segundos.

**Passo 5** – Hibridação e extensão a 73°C, durante 3 minutos.

(Os passos 4 e 5 foram repetidos 32 vezes)

**Passo 6** – Amplificação final a 73°C, durante 7 minutos.

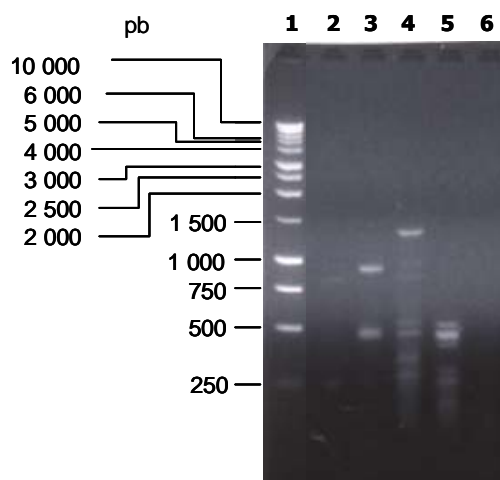
**Passo 7** – Permanência a 4°C em pausa.

O resultado da reacção de PCR foi verificado através de uma electroforese em gel de agarose 1.5%, cuja fotografia se encontra na figura I.4.6.

Nesta figura é possível observar diversas bandas, havendo já nalguns poços do gel um produto de PCR principal. No entanto, as bandas principais resultantes da primeira reacção de PCR podem não ser o produto pretendido. Na segunda reacção de PCR usou-se um iniciador interno em relação à zona amplificada na primeira reacção. Neste caso pretendia-se obter uma amplificação mais específica, pois mesmo que o primeiro iniciador hibride com outras sequências para além da sequência alvo, a probabilidade de o segundo iniciador também hibridar com as mesmas sequências é bastante baixa.

---

<sup>3</sup> Tendo em conta a  $T_m$  do PS6=79.1°C começou-se por experimentar uma temperatura dois graus acima (81°C). No entanto verificou-se que era preferível não ultrapassar 78°C visto que não se obter produtos de PCR acima disso.



**Figura I.4.6.** Gel de 1.5% de agarose da primeira reacção de PCR da técnica de “Genome Walking” no sentido do N-terminal. **Poços:** 1. Marcador de pesos moleculares 1kB (*Promega*); 2 a 5. Reacções de PCR usando como ADN molde as livrarias genómicas das enzimas *DraI*, *EcoRV*, *PvuII* e *StuI*, respectivamente.

### 3.1.2.3. Segunda Reacção de PCR

Na segunda reacção de PCR usou-se como ADN molde uma diluição de 1:50 do resultado da primeira reacção. Usaram-se os iniciadores PS7 e AP2 (fornecido no Kit *Clontech*).

O programa de PCR encontra-se descrito abaixo:

**Passo 1** – Desnaturação inicial da cadeia de ADN a 94°C, durante 25 segundos.

**Passo 2** – Desnaturação a 94°C, durante 25 segundos.

**Passo 3** – Hibridação e extensão a 77°C<sup>4</sup>, durante 3 minutos.

(Os passos 2 e 3 foram repetidos 5 vezes)

**Passo 4** – Desnaturação a 94°C, durante 25 segundos.

**Passo 5** – Hibridação e extensão a 72°C, durante 3 minutos.

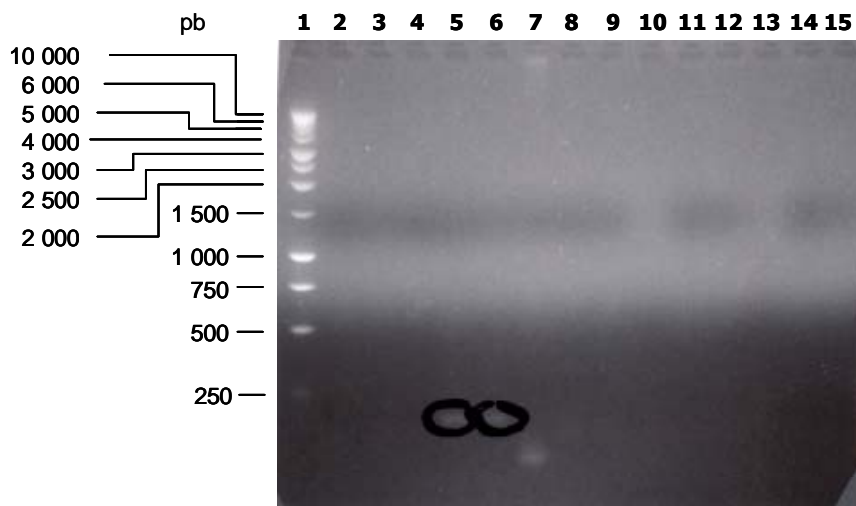
(Os passos 4 e 5 foram repetidos 24 vezes)

**Passo 6** – Amplificação final a 72°C, durante 7 minutos.

**Passo 7** – Permanência a 4°C em pausa.

<sup>4</sup> Tendo em conta a  $T_m$  do PS7=75°C seguiu-se a regra geral para as temperaturas de emparelhamento.

O resultado da reacção de PCR foi verificado através de uma electroforese em gel de agarose 1.5%, cuja fotografia se encontra na figura I.4.7.



**Figura I.4.7.** Gel de 1.5% de agarose da segunda reacção de PCR da técnica de “*Genome Walking*” no sentido do N-terminal. **Poços:** 1. Marcador de pesos moleculares 1kB (*Promega*); 2 a 12: reacções de PCR usando como ADN molde as primeiras reacções com as livrarias genómicas da enzima *DraI* (2 e 3), *EcoRV* (5 e 6), *PvuII* (8 e 9) e *StuI* (11 e 12).

### 3.1.2.4. Sequência Obtida

As bandas assinaladas no gel da figura I.4.7. (pertencentes à mesma reacção) foram extraídas e o seu ADN purificado, ligado ao plasmídeo e transformado em células competentes tal como anteriormente (ver secção 3 e Apêndice C). A sequência determinada para o fragmento encontra-se na figura I.4.8.

```

gatgagctgcggtgagcgcgccaacgcgatgttcaaaccgattcccgacaaggtcaccgag
D E L R E R A N A M F K P I P D K V T E
gtccgcggccagaaggtcagcgaagatcaggcaatgc
V R G Q K V S E D Q A M

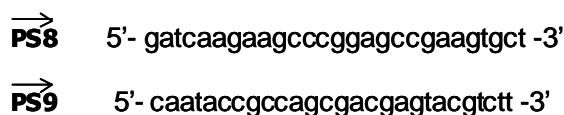
```

**Figura I.4.8.** Sequência do fragmento de ADN da CCP de *Ps. stutzeri* com a respectiva sequência de aminoácidos por ela codificada, obtida através da técnica de “*Genome Walking*” no sentido do N-terminal. A sequência do iniciador PS7 encontra-se destacada por uma caixa.

### 3.1.3. Sequenciação no sentido C-terminal

#### 3.1.3.1. Os Iniciadores

Para determinar a sequência de ADN a juzante da zona conhecida, desenharam-se dois iniciadores na cadeia codificante:



Na figura I.4.9 é possível observar a localização destes dois iniciadores na sequência de ADN conhecida.

```

gccaacgcgatgttcaagccgattcccgacaaggtcaccgaggtccgcggccagaaggtc
A N A M F K P I P D K V T E V R G Q K V
agcgaagatcaggcaatgctcggtcacaaactctggttcgacccgcgcctgtccagcagt
S E D Q A M L G H K L W F D P R L S S S
cacgtcatcagctgcaacacctgccacaacctgagcatcgggggcagcgacaacgtgcc
H V I S C N T C H N L S I G G S D N V P
acctcgatcgggtcacggctggcagaagggcccgcaactcgcccaccgtgctgaacgcc
T S I G H G W Q K G P R N S P T V L N A
gtattcaacgcgcgcagttctgggacggacgcgccaaggatctgcaggaacaggccaag
V F N A A Q F W D G R A K D L Q E Q A K
ggcccggtccaggcaagcgtggaatgaacagtacgccgagcgtgtcgtctcgacgtg
G P V Q A S V E M N S T P E R V V S T L
cagagcattccggagtacgccgccgagttcaagaaggccttccccaacgacaaggagccg
Q S I P E Y A A E F K K A F P N D K E P
gtcagtttcgacaacatggcctacgcccttgaagccttcgaagtcagcctgaccacgccg
V S F D N M A Y A L E A F E V S L T T P
aactcgccgttcgaccgcttcctcaaggggtgaggacggggcgctggacgacaagcagaaa
N S P F D R F L K G E D G A L D D K Q K
cagggctctcgccctgttcattggacgcgggtgctcttctgccacaacggcgtcaacctt
Q G L A L F M D A G C S S C H N G V N L
                                PS8
                                →
ggtggccagggttacttccccttcggcgtgatcaagaagcccggagccgaagtgtgccg
G G Q G Y F P F G V I K K P G A E V L P
                                PS9
                                →
accggcgacaagggcggttcgcggtgaccaataccgccagcgacgagtacgtcttccgt
T G D K G R F A V T N T A S D E Y V F R
gccgcgcgcgtgcgcaatgtcgcgttgacccgcgcgtacttccacagcggttaaggctcgg
A A P L R N V A L T P P Y F H S G K V W
gaa
E
    
```

**Figura I.4.9.** Localização na sequência de ADN da CCP de *Ps. stutzeri*, dos iniciadores PS8 e PS9 para a primeira e segunda reacção de PCR no sentido do C-terminal.

### 3.1.3.2. Primeira Reacção de PCR

Utilizaram-se as bibliotecas genómicas anteriormente construídas para a realização da primeira reacção de PCR com os iniciadores PS8 e AP1.

O programa de PCR usado foi o seguinte:

**Passo 1** – Desnaturação inicial da cadeia de ADN a 94°C, durante 25 segundos.

**Passo 2** – Desnaturação a 94°C, durante 25 segundos.

**Passo 3** – Hibridação e extensão a 78°C<sup>5</sup>, durante 3 minutos.

(Os passos 2 e 3 foram repetidos 7 vezes)

**Passo 4** – Desnaturação a 94°C, durante 25 segundos.

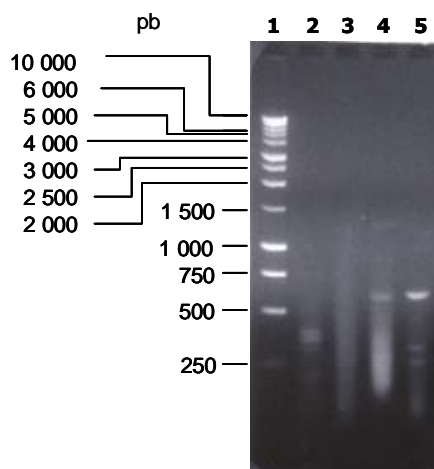
**Passo 5** – Hibridação e extensão a 73°C, durante 3 minutos.

(Os passos 4 e 5 foram repetidos 32 vezes)

**Passo 6** – Amplificação final a 73°C, durante 7 minutos.

**Passo 7** – Permanência a 4°C em pausa.

O resultado da reacção de PCR foi verificado através de uma electroforese em gel de agarose 1.5%, cuja fotografia se encontra na figura I.4.10.



**Figura I.4.10.** Gel de 1.5% de agarose da primeira reacção de PCR da técnica de “Genome Walking” no sentido do C-terminal. **Poços:** 1. Marcador de pesos moleculares 1kB (*Promega*); 2 a 5. Reacções de PCR usando como ADN molde as livrarias genómicas das enzimas *DraI*, *EcoRV*, *PvuII* e *StuI*, respectivamente.

<sup>5</sup> Tendo em conta a  $T_m$  do PS8=78.5°C usou-se uma temperatura de emparelhamento para os primeiros ciclos de 78°C, visto que já se havia verificado não ser aconselhável ultrapassar aquela temperatura.



### 3.1.3.3. Segunda Reacção de PCR

Na segunda reacção de PCR usou-se como ADN molde uma diluição de 1:50 do resultado da primeira reacção. Usaram-se os iniciadores PS9 e AP2.

O programa de PCR usado encontra-se descrito abaixo:

**Passo 1** – Desnaturação inicial da cadeia de ADN a 94°C, durante 25 segundos.

**Passo 2** – Desnaturação a 94°C, durante 25 segundos.

**Passo 3** – Hibridação e extensão a 75°C<sup>6</sup>, durante 3 minutos.

(Os passos 2 e 3 foram repetidos 5 vezes)

**Passo 4** – Desnaturação a 94°C, durante 25 segundos.

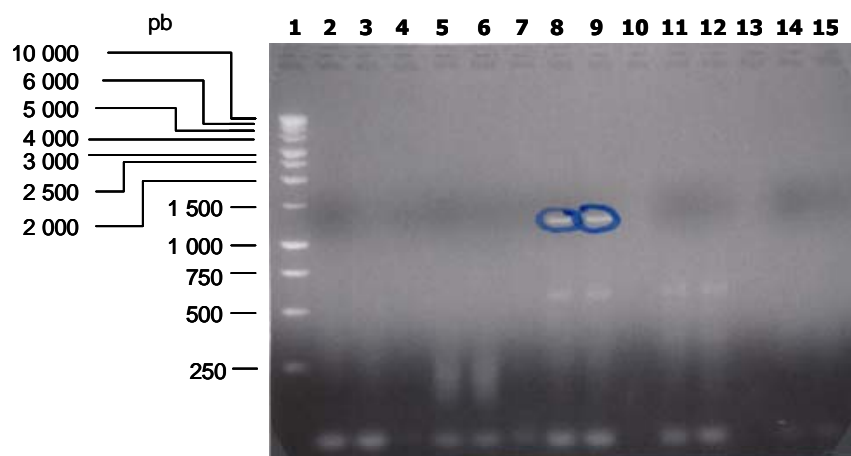
**Passo 5** – Hibridação e extensão a 70°C, durante 3 minutos.

(Os passos 4 e 5 foram repetidos 24 vezes)

**Passo 6** – Amplificação final a 70°C, durante 7 minutos.

**Passo 7** – Permanência a 4°C em pausa.

O resultado da reacção de PCR foi verificado através de uma electroforese em gel de agarose 1.5%, cuja fotografia se encontra na figura I.4.11.



**Figura I.4.11.** Gel de 1.5% de agarose da segunda reacção de PCR da técnica de “Genome Walking” no sentido do C-terminal. Poços: **1.** Marcador de pesos moleculares 1kB (*Promega*); **2 a 12:** reacções de PCR usando como ADN molde as primeiras reacções com as livrarias genómicas da enzima *DraI* (**2 e 3**), *EcoRV* (**5 e 6**), *PvuII* (**8 e 9**) e *StuI* (**11 e 12**).

<sup>6</sup>  $T_m$  do PS9=75.1°C. A temperatura de 77°C inicialmente testada não deu origem a produto de PCR, por isso teve que se baixar para 75°C.

### 3.1.3.4. Sequência Obtida

Após obtenção do produto amplificado por “*Genome Walking*” a partir do gel de agarose, seguiu-se o procedimento descrito anteriormente. A sequência determinada para o fragmento de ADN correspondente ao C-terminal da CCP de *Ps. stutzeri* encontra-se na figura I.4.12.

```

aataccgccagcgacgagtagctcttcggtgccgcgcgcgtgcgcaatgtcgcgttgacc
N T A S D E Y V F R A A P L R N V A L T
ccgccgtacttccacagcggtaggtctgggagctcgaaacaggccgttgccatcatgggt
P P Y F H S G E V W E L E Q A V A I M G
gacagccaactggccgtaaaactggacaaggacgaagtcagcgcgattaccgcgttcctg
D S Q L G R K L D K D E V S A I T A F L
cacagcgtgaccggcgagcagccgcaagtcgcctatccggtacttcccgccagcaccgcg
H S V T G E Q P Q V A Y P V L P A S T A
aacactccgaagcccgagtga
N T P K P E -

```

**Figura I.4.12.** Fragmento da sequência de ADN da CCP de *Ps. stutzeri* com a respectiva sequência de aminoácidos por ela codificada, obtido através da técnica de “*Genome Walking*” no sentido do C-terminal. A sequência do iniciador PS9 encontra-se evidenciada através de uma caixa. Na sequência de aminoácidos (–) significa o codão de terminação.

## 4. Sequência da Peroxidase do Citocromo c de *Pseudomonas stutzeri*

Através da técnica de “*Gemone Walking*” em ambos os sentidos em relação à sequência de ADN inicialmente conhecida, conseguiu-se obter a totalidade da sequência de ADN e consequentemente aminoácidos, da CCP madura de *Ps. stutzeri*. Esta é apresentada na figura I.4.13.

Na figura I.4.14. compara-se a sequência da CCP de *Ps. stutzeri* com a sequência proposta para a localização do sítio II de ligação ao cálcio na CCP de *Pa. denitrificans* e com a sequência *consensus* de ligação ao cálcio noutras proteínas. Da análise da comparação das três sequências não parece provável que na CCP de *Ps. stutzeri* esta seja uma zona de ligação ao cálcio. Como se sabe que a CCP de *Ps. stutzeri* possui um sítio de ligação ao cálcio de alta afinidade cujo efeito na actividade e formação de características de spin alto é idêntico ao do sítio II na CCP de *Pa. denitrificans*, é pouco provável que a localização do sítio II em *Pa. denitrificans* seja a da figura I.4.14.

Na figura I.4.15. faz-se a comparação da sequência de aminoácidos da CCP *Ps. stutzeri* com as de outras CCP's bacterianas. Através dessa comparação pode verifica-se a grande homologia entre a CCP de *Ps. stutzeri* e as restantes CCP's bacterianas.

```

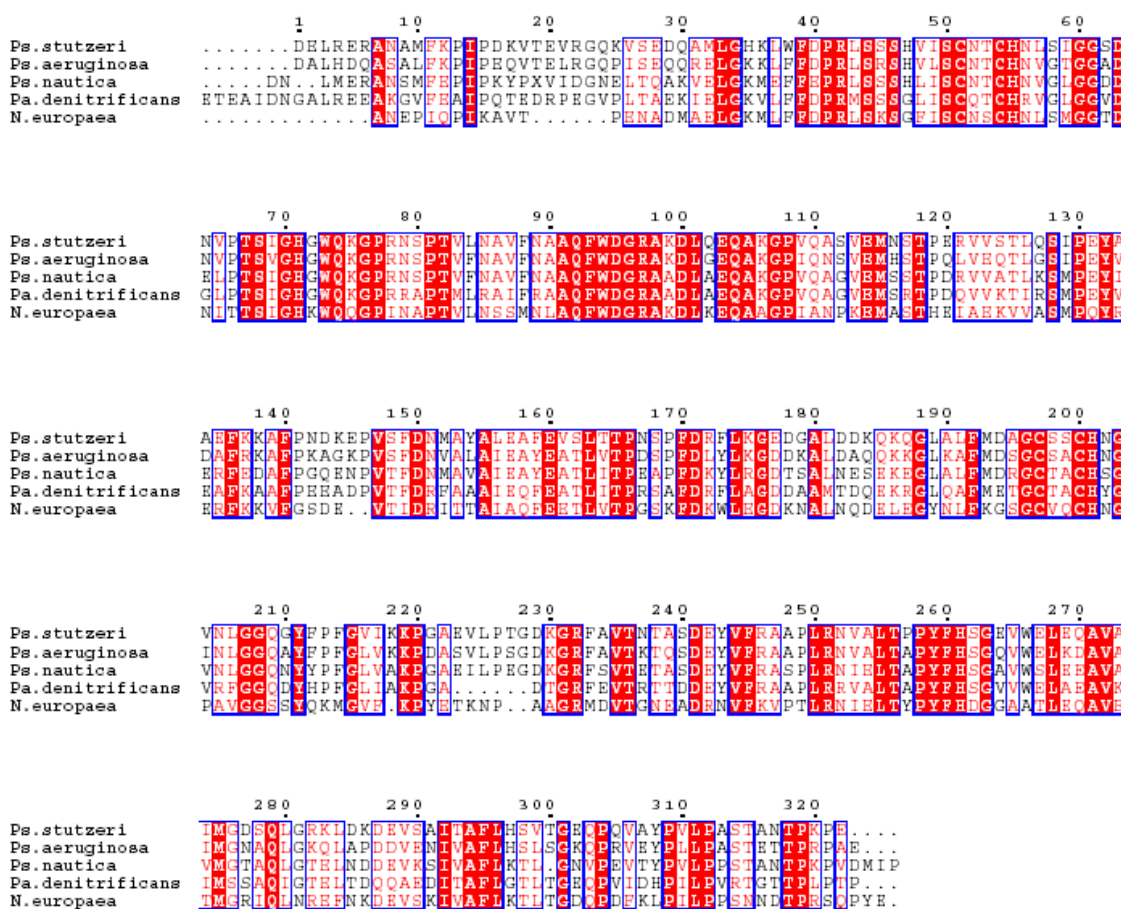
gatgagctgcggtgagcgcgccaacgcgatgttcaagccgattcccgacaaggtcaccgag
D E L R E R A N A M F K P I P D K V T E
gtccgcggccagaaggtcagcgaagatcaggcaatgctcggtcacaaactctggttcgac
V R G Q K V S E D Q A M L G H K L W F D
ccgcgcctgtccagcagtcacgtcatcagctgcaacacctgccacaacctgagcatcggg
P R L S S S H V I S C N T C H N L S I G
ggcagcgacaacgtgccaacctcgatcgggtcacggctggcagaagggccgcgcaactcg
G S D N V P T S I G H G W Q K G P R N S
cccaccgtgctgaacgccgtattcaacgccgcgcagttctgggacggacgcgccaaggat
P T V L N A V F N A A Q F W D G R A K D
ctgcaggaacaggccaagggcccggtccaggcaagcgtggaatgaacagtacgcccag
L Q E Q A K G P V Q A S V E M N S T P E
cgtgctcgtctcgacgctgcagagcattccggagtacgccgcgagttcaagaaggccttc
R V V S T L Q S I P E Y A A E F K K A F
cccaacgacaaggagccggtcagtttcgacaacatggcctacgccctggaagccttcgaa
P N D K E P V S F D N M A Y A L E A F E
gtcagcctgaccacgccgaactcgccgttcgaccgcttcctcaagggtgaggacggggcg
V S L T T P N S P F D R F L K G E D G A
ctggacgacaagcagaaacagggtctcgccctgttcattggacgccgggtgctcttcctgc
L D D K Q K Q G L A L F M D A G C S C
cacaacggcgctcaaccttggtggccagggttacttccccttcggcggtgatcaagaagccc
H N G V N L G G Q G Y F P F G V I K K P
ggagccgaagtgctgccgaccggcgacaagggcggttcgcgggtgaccaataccgccagc
G A E V L P T G D K G R F A V T N T A S
gacgagtacgtcttccgtgccgcgcgctgcgcaatgtcgcggttgaccccgccgtacttc
D E Y V F R A A P L R N V A L T P P Y F
cacagcggtgaggtctgggagctcgaacaggccggttgccatcatgggtgacagccaactg
H S G E V W E L E Q A V A I M G D S Q L
ggccgtaaacctggacaaggacgaagtcagcgcgattaccgcggttcctgcacagcgtgacc
G R K L D K D E V S A I T A F L H S V T
ggcgagcagccgcaagtcgcctatccgggtacttcccgcagcaccgcgaacactccgaag
G E Q P Q V A Y P V L P A S T A N T P K
cccgagtga
P E -

```

**Figura I.4.13.** Sequência total de ADN da CCP de *Ps. stutzeri* com os respectivos aminoácidos codificados por baixo de cada codão.

- (1)           72                               80  
 GLGGVDGLP
- (2)       S I G G S D N V P
- (3)       G G X G X D X  $\phi$  X

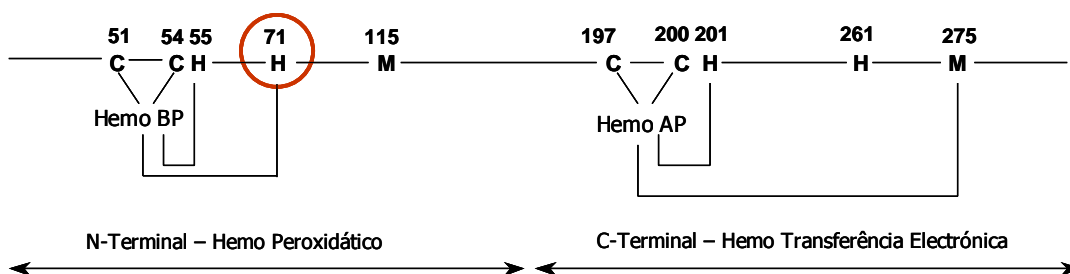
**Figura I.4.14.** Comparação da sequência da CCP de *Ps. stutzeri* com a localização proposta para o sítio II de ligação ao cálcio na CCP de *Pa. denitrificans* e com a sequência *consensus* encontrada nas proteínas contendo barris- $\beta$  (1) CCP de *Pa. denitrificans* [4] (2) CCP de *Ps. stutzeri*. (3) Sequência *consensus* [6] (X é um resíduo qualquer e  $\phi$  é um resíduo hidrofóbico, com preferência para uma leucina) .



**Figura I.4.15.** Comparação das sequências de aminoácidos das CCP's bacterianas isoladas de *Ps. stutzeri*, *Ps. aeruginosa* [3], *Ps. nautica* [2], *Pa. denitrificans* [4] e *N. europaea* [7].

A comparação das sequências da figura I.4.15 permite-nos verificar ainda quais os ligandos axiais dos hemos e a histidina que é deslocada, durante a activação da enzima na forma semi-reduzida. Estas características são mais facilmente observadas no esquema da figura I.4.16.

O hemo BP, ligado ao domínio N-terminal da CCP de *Ps. stutzeri* liga-se à cadeia polipeptídica através das cisteínas 51 e 54. Os seus ligandos axiais são as histidinas 55 e 71, sendo este último resíduo o ligando deslocado durante a activação da enzima. O hemo AP, no domínio C-terminal da CCP, está ligado à cadeia polipeptídica através das cisteínas 197 e 200. Os seus ligandos axiais são a histidina 201 e a metionina 275. Encontram-se ainda assinaladas a metionina 115 e a histidina 261, resíduos conservados em todas as sequências e que poderão exercer alguma função no mecanismo catalítico da CCP.



**Figura I.4.16.** Representação esquemática da sequência de aminoácidos da CCP de *Ps. stutzeri*, evidenciando os ligandos axiais dos hemos e as cisteínas que os ligam covalentemente à cadeia polipeptídica.

A partir da sequência de aminoácidos da CCP de *Ps. stutzeri* pode-se calcular a sua massa molecular e o seu ponto isoeléctrico. O valor obtido para a massa molecular de 36 246.6 Da, tendo em conta a existência de dois hemos do tipo *c*, está em concordância com o resultado da espectrometria de massa, 36 248.5, apresentado no Capítulo 3. O ponto isoeléctrico calculado a partir da sequência de aminoácidos é 5.26.

## 5. Bibliografia

1. Siebert, P. D., Chenchik, A., Kellogg, D. E., Lukyanov, K. A. e Lukyanov, S. A. (1995) "An improved PCR method for walking in uncloned genomic DNA." *Nucleic Acids Research* **23**, 1987-1088
2. Dias, J. M., Alves, T., Bonifacio, C., Pereira, A. S., Bourgeois, D., Moura, I. e Romao, M. J. (2004) "Structural basis for the mechanism of Ca<sup>2+</sup> activation of the di-heme cytochrome *c* peroxidase from *Pseudomonas nautica* 617." *Structure* (in press)
3. Ronnberg, M., Kalkkinen, N. e Ellfolk, N. (1989) "The primary structure of *Pseudomonas* cytochrome *c* peroxidase." *FEBS Lett* **250**, 175-178
4. Hu, W., Van Driessche, G., Devreese, B., Goodhew, C. F., McGinnity, D. F., Saunders, N., Fulop, V., Pettigrew, G. W. e Van Beeumen, J. J. (1997) "Structural characterization of *Paracoccus denitrificans* cytochrome *c* peroxidase and assignment of the low and high potential heme sites." *Biochemistry* **36**, 7958-7966
5. Deckert, G., Warren, P. V., Gaasterland, T., Young, W. G., Lenox, A. L., Graham, D. E., Overbeek, R., Snead, M. A., Keller, M., Aujay, M., Huber, R., Feldman, R. A., Short, J. M., Olsen, G. J. e Swanson, R. V. (1998) "The complete genome of the hyperthermophilic bacterium *Aquifex aeolicus*." *Nature* **392**, 353-358
6. Sprang, S. R. (1993) "On a (β-) roll." *TIBS* **18**, 313-314
7. Shimizu, H., Schuller, D. J., Lanzilotta, W. N., Sundaramoorthy, M., Arciero, D. M., Hooper, A. B. e Poulos, T. L. (2001) "Crystal structure of *Nitrosomonas europaea* cytochrome *c* peroxidase and the structural basis for ligand switching in bacterial di-heme peroxidases." *Biochemistry* **40**, 13483-13490

## *CAPÍTULO 5*

---

---

# Estrutura Tridimensional e Implicações Mecanísticas

---

---

Capítulo 5 – Estrutura Tridimensional por Cristalografia de Raios-X e Implicações Mecánísticas

1. Introdução .....	103
2. A Estrutura Tridimensional da CCP de <i>Ps. stutzeri</i> .....	103
2.1. Estrutura Tridimensional do Dímero .....	106
2.2. O Cálcio .....	108
3. Bibliografia .....	111



## 1. Introdução

A CCP de *Ps. stutzeri*, ao contrário da CCP de *Pa. denitrificans* possui já, na forma nativa, cálcio no seu sítio de ligação de alta afinidade, o qual apresenta propriedades de regulação da enzima semelhantes ao sítio II descrito para a CCP de *Pa. denitrificans* [1, 2]. Devido ao facto de não se conhecer uma dependência de cálcio na CCP de *Ps. aeruginosa*, foi proposto que o cálcio observado na sua estrutura tridimensional correspondesse ao sítio I de ligação ao cálcio da CCP de *Pa. denitrificans* [3]. A presença de cálcio neste sítio não teria influência no processo de activação da enzima, e portanto a CCP de *Ps. aeruginosa* não necessitaria de cálcio para se tornar activa.

A resolução das estruturas tridimensionais das CCP's de *Ps. nautica* [4] e *N. europaea* [5] revelaram a presença de um único ião cálcio localizado entre os dois domínios, tal como havia sido anteriormente observado na estrutura da CCP de *Ps. aeruginosa*. No caso da CCP de *N. europaea* não se conhece uma dependência de cálcio para a sua activação [6], mas a CCP de *Ps. nautica* apresenta uma dependência de cálcio muito semelhante à da CCP de *Pa. denitrificans* [7]. Apesar disso, o facto de não se ter conseguido verificar a existência de um segundo sítio de ligação ao cálcio na estrutura desta última enzima, possivelmente na interface do dímero, pode ser justificada por uma baixa afinidade para o cálcio na forma oxidada da CCP de *Ps. nautica*, tal como acontece com a CCP de *Pa. denitrificans*. Como a proteína foi cristalizada na forma oxidada, é possível que o sítio II não esteja preenchido.

Tendo em conta que a forma oxidada da CCP de *Ps. stutzeri* apresenta já o cálcio essencial à activação da enzima, a resolução da sua estrutura tridimensional deverá permitir localizar de uma vez por todas o sítio de ligação ao cálcio.

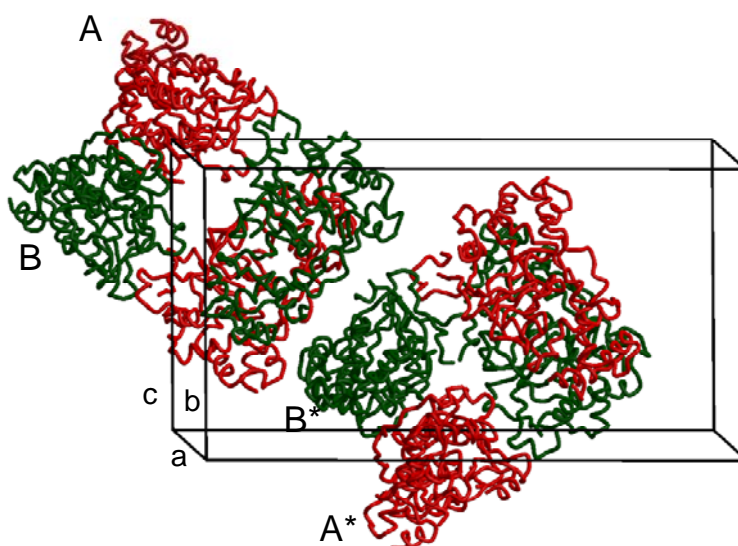
## 2. A Estrutura Tridimensional da CCP de *Ps. stutzeri*

A estrutura tridimensional da CCP de *Ps. stutzeri* foi resolvida através da técnica de Cristalografia de Raios-X pelo grupo da Professora Maria João Romão<sup>1</sup>. Os cristais foram obtidos a partir de uma preparação de proteína com a razão de pureza de  $A_{410}/A_{280}$  igual a 4.4, usando citrato de sódio e PEG 8000 como precipitantes. Os dados foram adquiridos sob

---

<sup>1</sup> As figuras apresentadas neste capítulo foram gentilmente cedidas pelo grupo de Cristalografia de Raios-X da Professora Maria João Romão. À excepção da figura I.5.1. todas as outras figuras foram concebidas especialmente para esta tese pelo Doutor José Trincão.

condições criogénicas usando radiação de sincrotrão, atingindo-se uma resolução de 1.6 Å. Os cristais pertencem ao grupo espacial  $P2_1$ . Na unidade assimétrica encontraram-se quatro moléculas de CCP, correspondentes a um par de dímeros, tal como pode ser observado na figura I.5.1.



**Figura I.5.1.** Dois homotetrâmeros e uma célula unitária mostrando o empacotamento cristalográfico. A e B formam um dímero funcional [8].

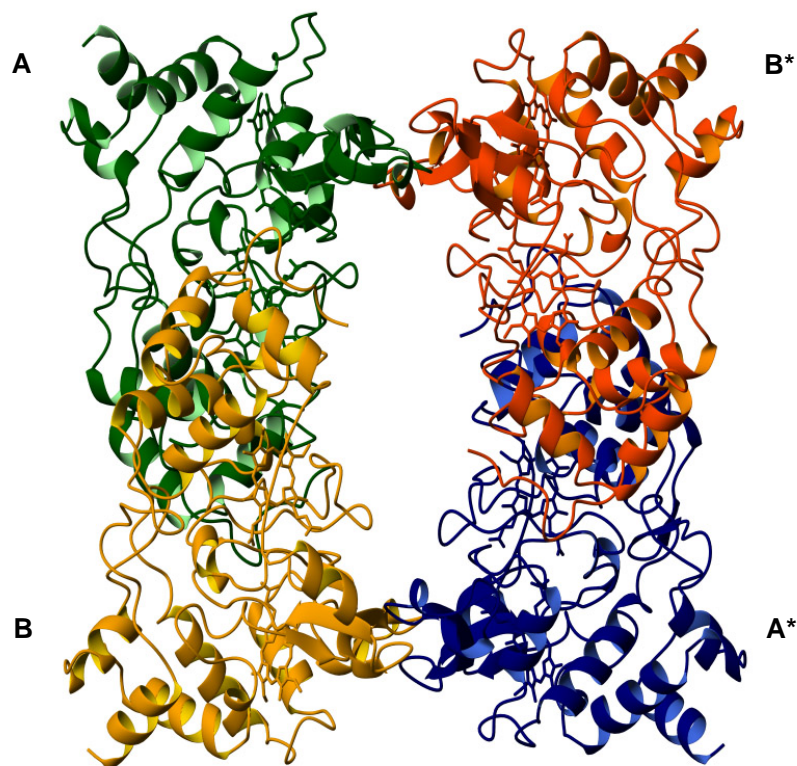
Na figura I.5.2. pode observar-se com mais pormenor o par de dímeros presentes na unidade assimétrica, verificando-se que existem alguns contactos entre eles. A tabela I.5.1. apresenta os aminoácidos que estabelecem os contactos do tetrâmero cristalográfico.

No capítulo 3, secção 2.2.3, foi referido que após adição de cálcio à forma nativa da CCP de *Ps. stutzeri*, havia a formação de agregados com massa molecular superior à do dímero, que não puderam, no entanto, ser identificados unicamente como tetrâmeros. A existência do tetrâmero cristalográfico é assim concordante com a tetramerização da enzima por adição de cálcio à forma nativa (com o sítio de alta afinidade já preenchido). Apesar disso, não se verificou na estrutura cristalográfica a presença de cálcio nas zonas de contacto entre os dímeros. Isto pode ser justificado pelo facto de a CCP ter sido cristalizada sem adição de cálcio.

**Tabela I.5.1.** Aminoácidos que em cada monômero estão envolvidos na interação do homotetrâmero cristalográfico.

Aminoácido	Posição na sequência
arginina	97
glicina	215
isoleucina	217
lisina	219
prolina	220
glicina	221
alanina	222
ácido glutâmico	223
valina	224
leucina	225
glicina	231
treonina	236
asparagina	237
treonina	238
alanina	239
serina	240
alanina	242
tirosina	243
fenilalanina	245

---

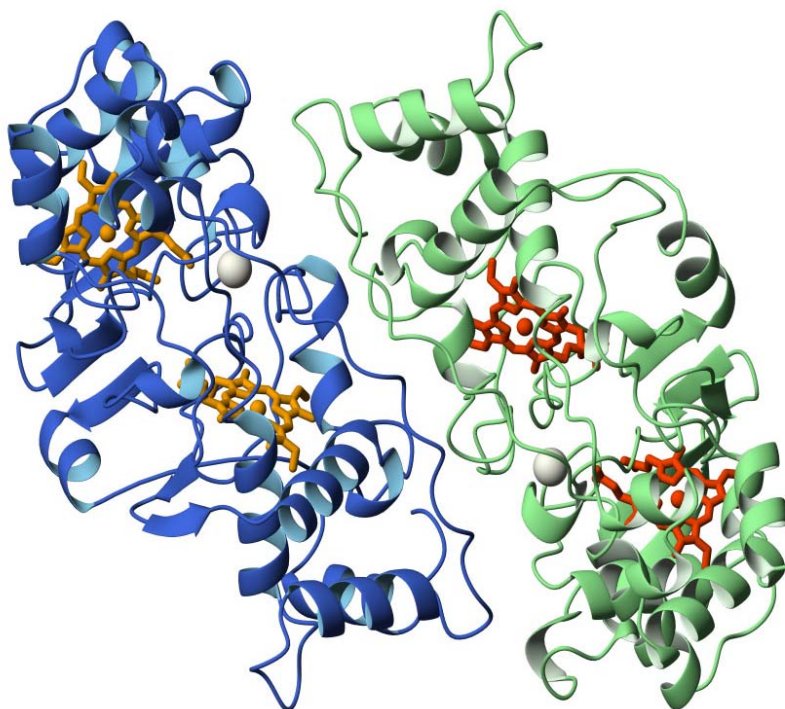


**Figura I.5.2.** Homotetrâmero cristalográfico. A e B formam um dímero funcional

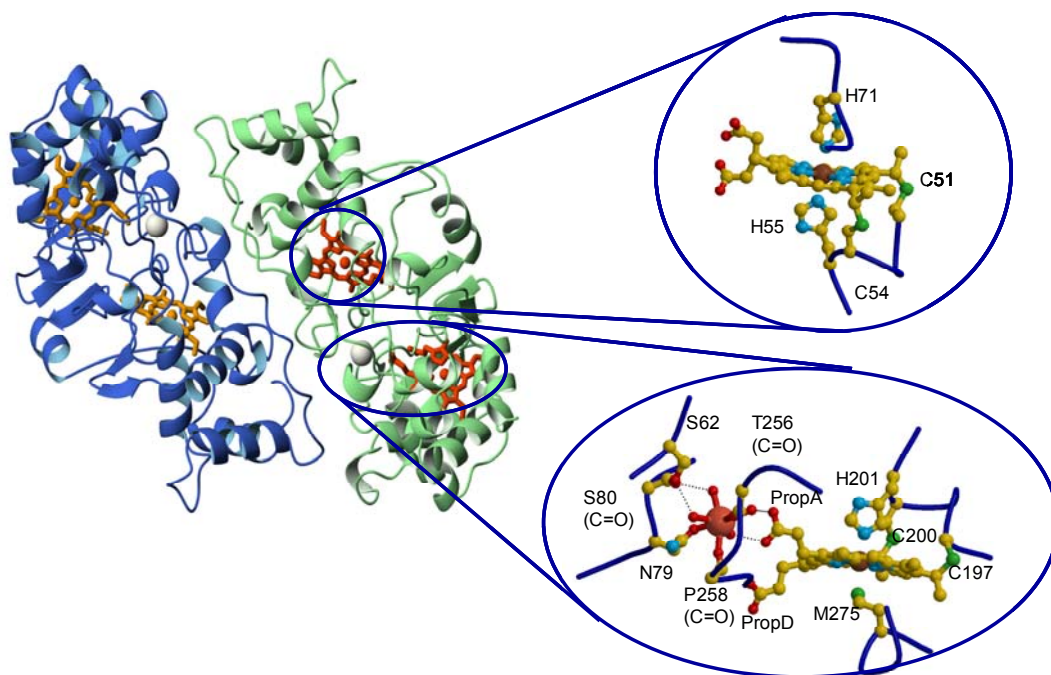
## 2.1. Estrutura Tridimensional do Dímero

A estrutura do dímero da CCP de *Ps. stutzeri*, a qual se pensa ser a unidade funcional desta enzima, pode ser observada na figura I.5.3. Após exposição à radiação de sincrotrão para recolha dos dados verificou-se que o cristal da CCP de *Ps. stutzeri* se manteve no estado oxidado através de um espectro de visível do cristal. Assim, a estrutura aqui apresentada não é a da enzima activa, mas sim da forma nativa, antes da activação.

Na figura I.5.4. pode ser observado em mais pormenor que neste estado de oxidação ambos os hemos se apresentam hexacoordenados. Tal como foi previsto no capítulo anterior, através da comparação da sequência de aminoácidos da CCP de *Ps. stutzeri* com as das restantes CCP's bacterianas, o hemo ligado ao domínio C-terminal (hemo AP no estado oxidado) apresenta como ligandos axiais a metionina 275 e a histidina 201. O anel porfirínico deste hemo encontra-se ligado à cadeia polipeptídica através das cisteínas 197 e 200. O hemo do domínio N-terminal apresenta como ligandos axiais as histidinas 55 e 71, e o seu anel porfirínico coordena-se à cadeia polipeptídica através das cisteínas 51 e 54.



**Figura I.5.3.** Estrutura tridimensional do dímero funcional da CCP de *Ps. stutzeri* determinada por Cristalografia de Raios-X. O cálcio observado na estrutura apresenta-se a cinzento.



**Figura I.5.4.** Estrutura tridimensional da CCP de *Ps. stutzeri* determinada por Cristalografia de Raios-X evidenciando a coordenação dos hemos e do cálcio (a vermelho).

No capítulo 3, secção 2.2.3, os resultados da determinação da massa molecular revelaram que a CCP de *Ps. stutzeri* é um dímero no seu estado nativo, ao contrário da CCP de *Pa. denitrificans* que se encontra num equilíbrio dímero monómero. Com o objectivo de perceber a razão da estabilidade do dímero da CCP nativa de *Ps. stutzeri*, analisou-se quais os aminoácidos presentes na interface do dímero cristalográfico, sendo estes em maioria não carregados.

A comparação destes aminoácidos com os da superfície de contacto do dímero cristalográfico da estrutura da forma fechada da CCP de *Ps. nautica* (forma inactiva, sem cálcio, em que o hemo peroxidático se encontra hexacoordenado), que se supõe ser um monómero em solução, não revela alterações significativas, não se conseguindo justificar desta forma o facto da CCP de *Ps. stutzeri* ser um dímero na forma oxidada em solução.

## 2.2. O Cálcio

Nas figuras I.5.3. e I.5.4. podemos observar a presença de apenas um átomo de cálcio por monómero, localizado na interface dos dois domínios, tal como na estrutura da CCP de *Ps. aeruginosa* [3]. Não se verificou a existência de nenhum átomo de cálcio na interface do dímero como seria de esperar tendo em conta o modelo proposto para a CCP de *Pa. denitrificans* [1]. O cálcio presente na estrutura apresenta uma coordenação muito semelhante à observada nas estruturas das CCP's de *Ps. nautica* (forma aberta, com cálcio, em que o hemo peroxidático se encontra pentacoordenado) e *Ps. aeruginosa*. Na figura I.5.5. pode-se observar a coordenação dos hemos e do cálcio nas diversas estruturas conhecidas de CCP's bacterianas. Destas, apenas a forma fechada de *Ps. nautica* não apresenta o átomo de cálcio na interface dos dois domínios.

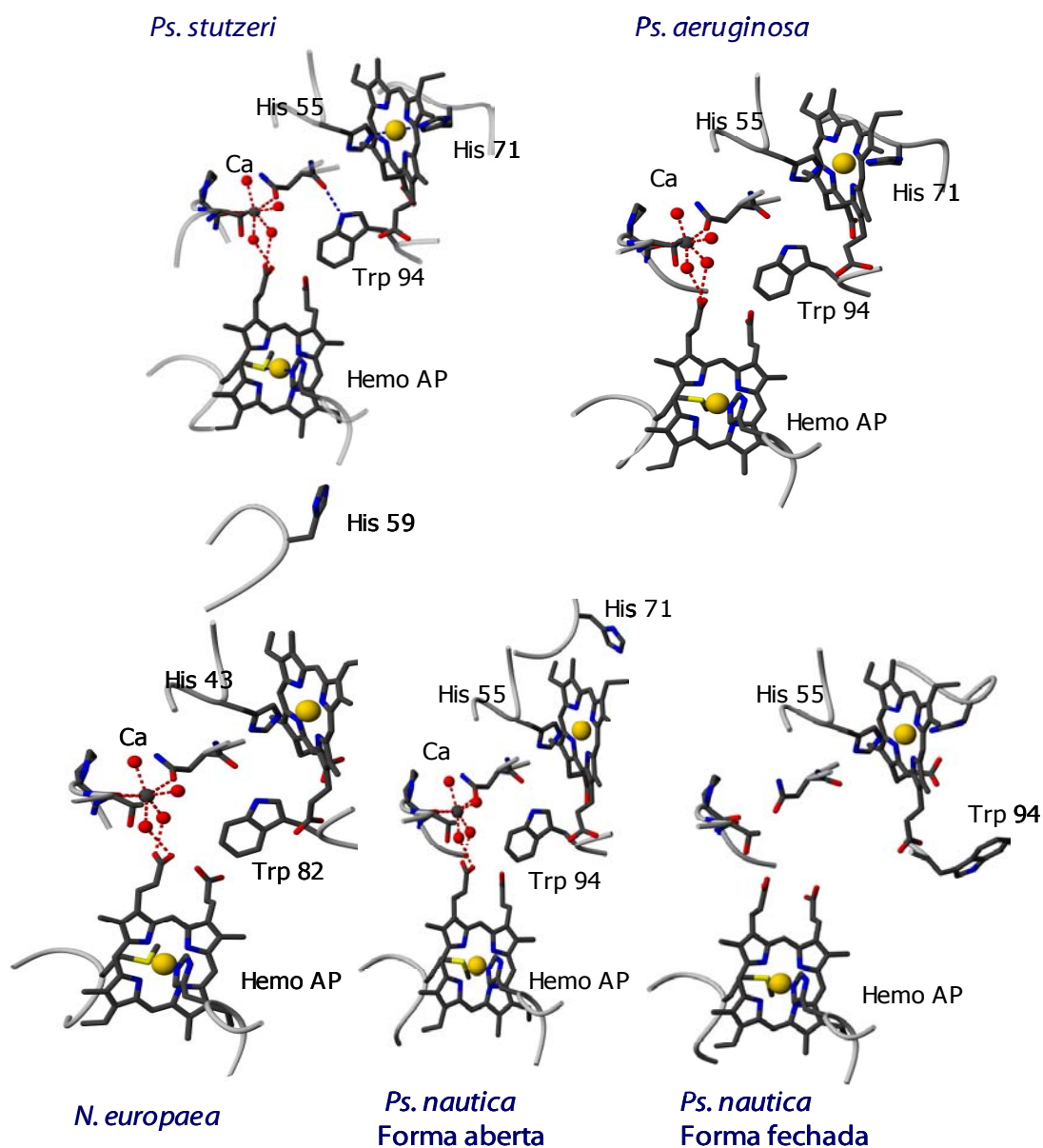
A esfera de coordenação do cálcio é constituída por quatro moléculas de água, a asparagina 79 e os grupos carboxílicos da cadeia principal da prolina 258 e da treonina 256.

Para a CCP de *Ps. nautica*, foram resolvidas estruturas de duas formas diferentes da enzima. Ambas se encontram no estado reduzido a julgar pelos espectros de visível dos cristais após exposição à radiação de sincrotrão. No entanto, uma das formas, a forma fechada, não apresenta o cálcio na interface dos dois domínios. A forma aberta não só apresenta o cálcio na interface dos dois domínios como se encontra na forma activa.

Tanto a forma aberta de *Ps. nautica* como a estrutura de *N. europaea* apresentam o hemo do domínio N-terminal pentacoordenado. No caso da estrutura da CCP de *N. europaea*, esta enzima é activa no estado oxidado [6], pelo que não é de estranhar que a estrutura obtida

seja a da forma activa. Em relação à CCP de *Ps. nautica*, os cristais foram reduzidos pela radiação de sincrotrão durante a aquisição dos dados, a presença de cálcio nesta forma e a elevada quantidade de solvente presente no cristal, permitiram a sua activação durante a redução. Nestas duas estruturas o “loop” que contém a histidina 71 em *Ps. nautica* e 59 em *N. europaea* coordenada ao hemo nas restantes estruturas sofreu um deslocamento para longe do plano do hemo permitindo que o triptofano 73 (61 em *N. europaea*) existente no mesmo “loop” passe a fazer parte dos contactos do dímero. O anel do triptofano 73 de um monómero encontra-se paralelo ao do outro monómero. Esta interacção poderá fazer com que o dímero desta forma seja mais estável.

Uma outra característica visível na comparação entre as diversas estruturas da figura I.5.5. é a orientação do triptofano 94 (82 na CCP de *N. europaea*), o qual se encontra numa posição favorável para mediar a transferência electrónica entre os dois hemos, à excepção da estrutura da forma fechada da CCP de *Ps. nautica*. Isto poderá querer dizer que a presença do cálcio entre os dois domínios orienta o triptofano 94 para que este assuma uma posição que permita a transferência electrónica entre os hemos durante o ciclo catalítico. É assim essencial à actividade.



**Figura I.5.5.** Comparação da coordenação dos hemos e do cálcio nas CCP's de *Ps. stutzeri*, *Ps. aeruginosa*, *Ps. nautica* (nas duas formas obtidas: fechada, sem cálcio, e aberta, com cálcio) e *N. europaea*. O cálcio encontra-se representado por uma esfera preta rodeada das quatro moléculas de água (vermelho) da sua esfera de coordenação.



### 3. Bibliografia

1. Gilmour, R., Prazeres, S., McGinnity, D. F., Goodhew, C. F., Moura, J. J. G., Moura, I. e Pettigrew, G. W. (1995) "The affinity and specificity of Ca(2+)-binding sites of cytochrome-c peroxidase from *Paracoccus denitrificans*." *Eur J Biochem* **234**, 878-886
2. Prazeres, S., Moura, I., Moura, J. J. G., Gilmour, R., Goodhew, C. F. e Pettigrew, G. (1993) "Control of the spin state of the peroxidatic haem by calcium ions in cytochrome c peroxidase from *Paracoccus denitrificans*: A <sup>1</sup>H NMR study." *Magnetic Ressonance in Chemistry* **31**, S68-S72
3. Fulop, V., Ridout, C. J., Greenwood, C. e Hajdu, J. (1995) "Crystal structure of the di-haem cytochrome c peroxidase from *Pseudomonas aeruginosa*." *Structure* **3**, 1225-1233
4. Dias, J. M., Alves, T., Bonifacio, C., Pereira, A. S., Bourgeois, D., Moura, I. e Romao, M. J. (2004) "Structural basis for the mechanism of Ca<sup>2+</sup> activation of the di-heme cytochrome c peroxidase from *Pseudomonas nautica* 617." *Structure*
5. Shimizu, H., Schuller, D. J., Lanzilotta, W. N., Sundaramoorthy, M., Arciero, D. M., Hooper, A. B. e Poulos, T. L. (2001) "Crystal structure of *Nitrosomonas europaea* cytochrome c peroxidase and the structural basis for ligand switching in bacterial di-heme peroxidases." *Biochemistry* **40**, 13483-13490
6. Arciero, D. M. e Hooper, A. B. (1994) "A di-heme cytochrome c peroxidase from *Nitrosomonas europaea* catalytically active in both the oxidized and half-reduced states." *J Biol Chem* **269**, 11878-11886
7. Alves, T., Besson, S., Duarte, L. C., Pettigrew, G. W., Girio, F. M., Devreese, B., Vandenberghe, I., Van Beeumen, J., Fauque, G. e Moura, I. (1999) "A cytochrome c peroxidase from *Pseudomonas nautica* 617 active at high ionic strength: expression, purification and characterization." *Biochim Biophys Acta* **1434**, 248-259
8. Bonifacio, C., Cunha, C. A., Muller, A., Timoteo, C. G., Dias, J. M., Moura, I. e Romao, M. J. (2003) "Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of the di-haem cytochrome c peroxidase from *Pseudomonas stutzeri*." *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **59**, 345-347



## *CAPÍTULO 6*

---

---

### Discussão e Conclusão

---

---

Capítulo 6 – Discussão e Conclusão

1. Integração dos Resultados.....	115
2. Perspectivas Futuras .....	118
3. Bibliografia .....	119

## 1. Integração dos Resultados

Na optimização da expressão da CCP durante o crescimento de *Ps. stutzeri*, verificou-se que condições de *stress* com baixo arejamento são essenciais à obtenção de um elevado rendimento nesta enzima. Uma explicação para este facto ser a oxidase do citocromo c alternativa com maior afinidade para o oxigénio que é expressa quando a bactéria *Ps. stutzeri* é crescida em condições de cultura microaerófilas. Esta enzima, apesar de apresentar uma maior afinidade para o oxigénio, poderá ser menos eficaz na sua redução produzindo uma maior quantidade de peróxido de hidrogénio, que leva a célula a aumentar a expressão da peroxidase do citocromo c [1, 2].

É essencial recolher as células no final da fase exponencial. Esta observação pode ser justificada por um papel mais importante das peroxidases na protecção das células durante o crescimento exponencial, ao passo que durante a fase estacionária essa função é essencialmente realizada pelas catalases. Esta preponderância da actividade de uma ou outra enzima, nas diferentes fases de crescimento das bactérias, foi verificada em *R. capsulatus* [3] através do uso de mutantes para a actividade de catalase.

Com base em tudo o que foi exposto sobre a CCP de *Ps. stutzeri*, verifica-se que esta enzima é purificada com cálcio fortemente ligado ao local que regula a activação da enzima. Para conseguir uma preparação desta CCP sem cálcio é necessário tratar a enzima no seu estado oxidado, com 1 mM EGTA. A CCP de *Ps. stutzeri* tratada com EGTA é inactiva mantendo-se ambos os hemos hexacoordenados, numa configuração de spin baixo.

Com a semi-redução a afinidade da CCP para o cálcio aumenta de tal forma que esta compete com o EGTA para o cálcio que este havia ligado no estado oxidado. A constante de afinidade da CCP no estado semi-reduzido para o cálcio é da ordem de grandeza da constante de ligação do cálcio ao EGTA ( $\approx 10^7$ ). O magnésio não consegue substituir o cálcio na ligação a este local e regulação das propriedades catalíticas da enzima.

Na estrutura tridimensional da CCP de *Ps. stutzeri* obtida através de Cristalografia de Raios-X, verificou-se a presença de cálcio na interface dos dois domínios de um monómero, no mesmo local em que este havia sido observado nas estruturas das restantes CCP's. O facto de não ter sido encontrado nenhum outro cálcio na estrutura da CCP de *Ps. stutzeri*, para além do que se encontra presente em todas as estruturas das CCP's conhecidas, leva à proposta de que este seja o chamado sítio II do modelo da CCP de *Pa. denitrificans*.

O cálcio e as suas propriedades reguladoras da actividade das CCP's bacterianas, em vez de ser um factor de distinção entre as CCP's isoladas de diferentes bactérias, como havia sido anteriormente proposto, é na realidade algo que estas têm em comum. Para muitas delas a dependência de cálcio não foi verificada por possuírem, tal como a CCP de *Ps. stutzeri*, uma alta afinidade para o cálcio que faz com que sejam purificadas com o sítio de ligação ao cálcio preenchido. O sítio de ligação ao cálcio de alta afinidade da CCP de *Ps. stutzeri* situa-se na interface dos dois domínios, sendo comum a todas as CCP's bacterianas cujas estruturas tridimensionais se conhecem.

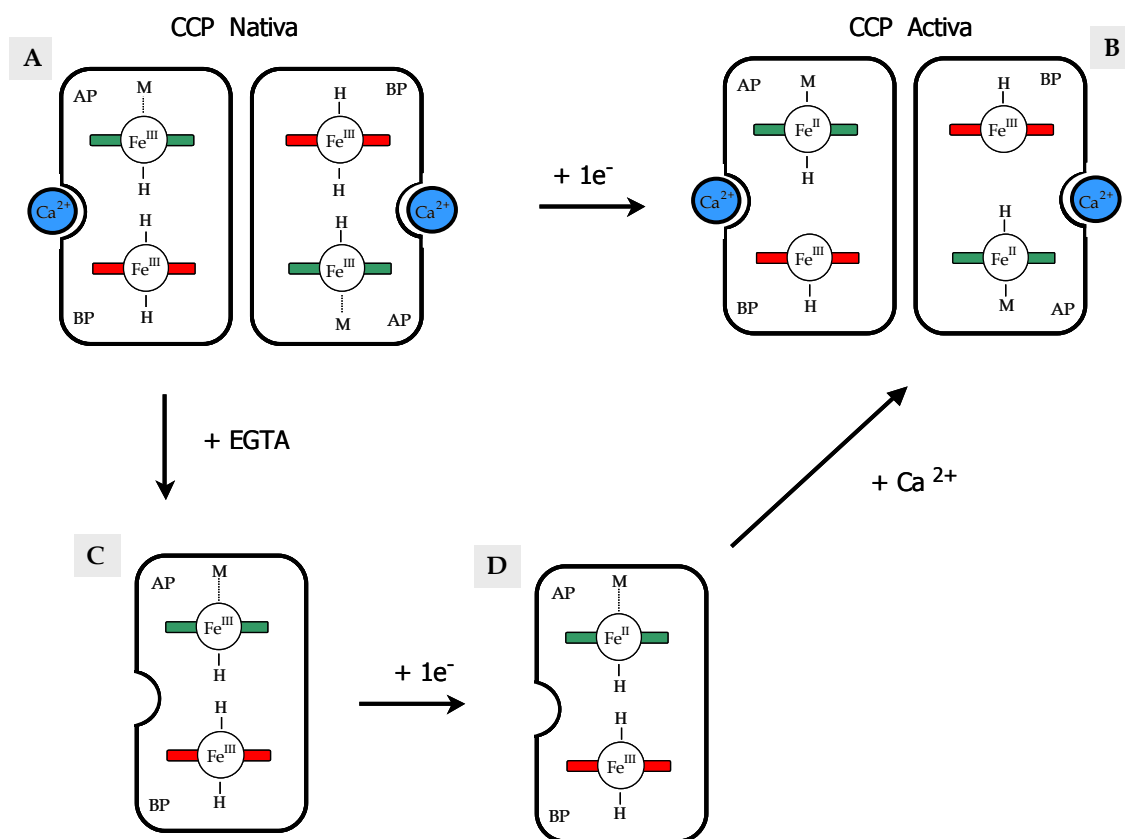
A principal diferença entre a CCP de *Ps. stutzeri* e a CCP de *Pa. denitrificans* é a afinidade do sítio de ligação ao cálcio essencial à regulação da activação da enzima, que é de alta afinidade na primeira e baixa na segunda. Este cálcio será essencial à activação da enzima promovendo, o deslocamento do "loop" que contém a histidina 71 aquando da semi-redução, o que faz com que o hemo do domínio N-terminal passe a apresentar uma posição de coordenação livre. A presença de cálcio neste sítio deverá ainda promover a orientação do triptofano 94, para que este possa mediar a transferência electrónica entre os dois hemos durante o mecanismo catalítico.

A estequiometria do sítio II proposto para a CCP de *Pa. denitrificans* deverá assim ser de um cálcio por monómero e não um por dímero como se pensava. Na CCP nativa de *Ps. stutzeri*, obteve-se um valor de 0.75  $\text{Ca}^{2+}$  por monómero, através de espectroscopia de emissão de Plasma, o que deverá reflectir um cálcio por monómero (dentro do erro experimental e tendo em conta a possibilidade da presença de algumas molécula de CCP sem cálcio nas preparações analisadas).

A existência de um sítio de ligação ao cálcio semelhante ao chamado sítio I do modelo proposto para a CCP de *Pa. denitrificans*, não ficou provada. No entanto, a adição de cálcio à CCP de *Ps. stutzeri* com o sítio de alta afinidade completamente preenchido (correspondente ao sítio II em *Pa. denitrificans*) provoca alterações nas propriedades catalíticas da enzima com o citocromo *c* de cavalo como doador electrónico, e no seu estado de agregação. Assim, aparentemente existe um outro local de ligação ao cálcio de baixa afinidade, provavelmente à superfície da molécula, mas diferente do sítio I da CCP de *Pa. denitrificans*. A ligação de cálcio a este sítio ou sítios é bastante fraca, mas provoca a formação de um tetrâmero por associação de dois dímeros. A presença deste cálcio à superfície da enzima provoca uma inibição da oxidação do citocromo *c* de cavalo, provavelmente devido a repulsão, uma vez que este citocromo apresenta um potencial electrostático de superfície francamente positivo.

As estruturas das duas formas distintas da CCP de *Ps. nautica*, bem como a estrutura da CCP de *N. europaea*, são indícios de que o modelo correcto para a activação das CCP's, de entre os dois que haviam sido propostos, deverá ser o modelo I proposto para a CCP de *Pa. denitrificans*. Neste modelo a histidina 85 (71 nas CCP's de *Ps. stutzeri* e *Ps. nautica*) é deslocada deixando uma posição livre para a ligação do substrato. No modelo II, a histidina 85 seria substituída pela metionina 129 (115 nas CCP's de *Ps. stutzeri* e *Ps. nautica*), o que não acontece nas duas estruturas da forma activa conhecidas.

Tendo em conta tudo o que foi exposto sobre a ligação do cálcio e o seu papel na regulação da CCP de *Ps. stutzeri* apresenta-se na figura I.6.1. o modelo de activação para esta enzima, que deverá ser comum às restantes CCP's bacterianas. Este modelo, muito semelhante ao modelo I proposto para a CCP de *Pa. denitrificans* apenas difere na localização e efeito dos sítios de ligação do cálcio na enzima.



**Figura I.6.1.** Mecanismo de activação proposto para a CCP de *Ps. stutzeri*. **A** Forma nativa, dímero **B**. Forma semi-reduzida, activa, dímero **C**. Forma oxidada sem cálcio, monómero. **D**. Forma semi-reduzida sem cálcio, inactiva, monómero. **AP** – hemo de alto potencial; **BP**- hemo de baixo potencial

Na estrutura da forma aberta CCP de *Ps. nautica* é visível que a metionina 115 conservada se encontra bastante próxima do hemo de baixo potencial. É provável que a transição de uma configuração de spin alto para spin baixo neste hemo, nas várias CCP's, com a diminuição da temperatura, seja devida à ligação da metionina 115 na sexta posição de coordenação do hemo de baixo potencial. Assim sendo, a configuração de spin baixo apresentada a baixa temperatura pelo hemo peroxidático, na forma semi-reduzida das CCP's, é diferente da configuração de spin baixo apresentada por este hemo na forma oxidada, justificando-se assim as diferenças no espectro de RPE.

## 2. Perspectivas Futuras

O conhecimento da estrutura tridimensional da CCP de *Ps. stutzeri* não permitiu responder a algumas das questões levantadas. Para perceber porque é que esta CCP se apresenta já sob a forma de dímero no estado oxidado, ao contrário da CCP de *Pa. denitrificans* seria essencial conhecer a estrutura da forma oxidada desta última CCP. A comparação das superfícies de contacto entre os dímeros cristalográficos das duas enzimas, talvez permita perceber esta diferença. Também o conhecimento da estrutura tridimensional da forma oxidada sem cálcio da CCP de *Ps. stutzeri* seria importante para perceber o que estabiliza o dímero.

Por outro lado, na estrutura tridimensional da forma aberta da CCP de *Ps. nautica* apesar de ser de uma forma reduzida, a redução ocorreu após a cristalização pelo que se pode argumentar que talvez a totalidade das modificações que dão origem à forma activa da enzima, ainda não tenha ocorrido. É essencial obter uma estrutura de uma forma semi-reduzida de uma CCP para que se possa verificar qual a configuração da forma activa da enzima.

Ainda para clarificar a estrutura da forma activa, seria importante fazer uma determinação da massa molecular da forma semi-reduzida com e sem cálcio. Todas as determinações das massas moleculares realizadas para verificação do estado de dímero ou monómero tanto na CCP de *Ps. stutzeri* como na de *Pa. denitrificans* foram realizadas no estado oxidado da enzima. A determinação da massa molecular, por ultracentrifugação, da forma semi-reduzida permitirá validar ou não a proposta de que a forma activa desta enzima é a dimérica.



### 3. Bibliografia

1. **Richardson, D. J.** (2000) "Bacterial respiration: a flexible process for a changing environment." *Microbiology* **146**, 551-571
2. **de Gier, J. W., Lubben, M., Reijnders, W. N., Tipker, C. A., Slotboom, D. J., van Spanning, R. J., Stouthamer, A. H. e van der Oost, J.** (1994) "The terminal oxidases of *Paracoccus denitrificans*." *Mol Microbiol* **13**, 183-196
3. **Hochman, A., Figueredo, A. e Wall, J. D.** (1992) "Physiological functions of hydroperoxidases in *Rhodobacter capsulatus*." *J Bacteriol* **174**, 3386-3391



---

---

## PARTE II

### A REDUTASE DO ÓXIDO NÍTRICO DE *Pseudomonas nautica*

---

---

Capítulo 1 – Introdução .....	123
Capítulo 2 – Purificação da Redutase do Óxido Nítrico de <i>Pseudomonas nautica</i> .....	163
Capítulo 3 – Caracterização Bioquímica e Espectroscópica .....	177
Capítulo 4 – Sequenciação e Modelação da Estrutura Tridimensional.....	195
Capítulo 5 – Discussão e Conclusão.....	221

## *CAPÍTULO 1*

---

---

### Introdução

---

---

## Capítulo 1 – Introdução

1. O Papel do Óxido Nítrico nos Sistemas Biológicos .....	125
1.1. O Papel do NO na Regulação da Pressão Sanguínea .....	126
1.2. O Papel do NO na Transmissão do Impulso Nervoso .....	127
1.3. O Papel do NO nos Processos Oxidativos .....	128
1.4. O Papel do NO na Resposta Imunitária e na Citotoxicidade .....	128
1.5. O Papel do NO Noutros Processos de Sinalização .....	130
2. A Via Metabólica da Desnitificação.....	130
2.1 O Ciclo do Azoto .....	131
2.2. As Enzimas Envolvidas na Desnitificação.....	133
2.2.1. A Redutase do Nitrato .....	135
2.2.2. A Redutase do Nitrito .....	136
2.2.3. A Redutase do Óxido Nítrico.....	137
2.2.4. A Redutase do Óxido Nitroso.....	137
3. A Superfamília das Oxidases Hemo-Cobre .....	138
4. As Redutases do Óxido Nítrico .....	140
4.1. Diferentes Classes de Redutases do Óxido Nítrico.....	141
4.1.1. cNOR .....	142
4.1.1.1. Os Genes que Codificam para a cNOR.....	144
4.1.1.2. Propriedades Espectroscópicas.....	145
4.1.1.3. A Estrutura do Centro Activo. Mecanismo catalítico.....	148
4.1.2. qNOR.....	150
4.1.3. qCuNOR .....	151
4.2. Relação Entre as Oxidases Terminais Hemo-Cobre e as Redutases do Óxido Nítrico	153
4.2.1. Estrutura Prevista para a Redutase do Óxido Nítrico .....	153
5. Bibliografia .....	156

## 1. O Papel do Óxido Nítrico nos Sistemas Biológicos

Durante muito tempo o óxido nítrico (NO)<sup>1</sup> foi encarado apenas como um produto perigoso e desagradável da oxidação da amónia e da combustão incompleta da gasolina nos motores dos automóveis. Pensava-se que o NO, tal como acontece com o monóxido de carbono ou o cianeto, se ligava irreversivelmente aos centros metálicos, funcionando como um veneno especialmente no que diz respeito aos processos respiratórios. No entanto, nos anos 80, descobriu-se que esta molécula é um dos mais importantes reguladores fisiológicos, exercendo um papel fundamental na transdução de sinais e na citotoxicidade.

O NO é produzido, juntamente com outros óxidos de azoto, nos motores de combustão por reacção do N<sub>2</sub> com o O<sub>2</sub> atmosféricos, a temperaturas elevadas. Estes gases são importantes poluentes atmosféricos, sendo dos principais responsáveis pela formação de “smog” e das chuvas ácidas [1, 2].

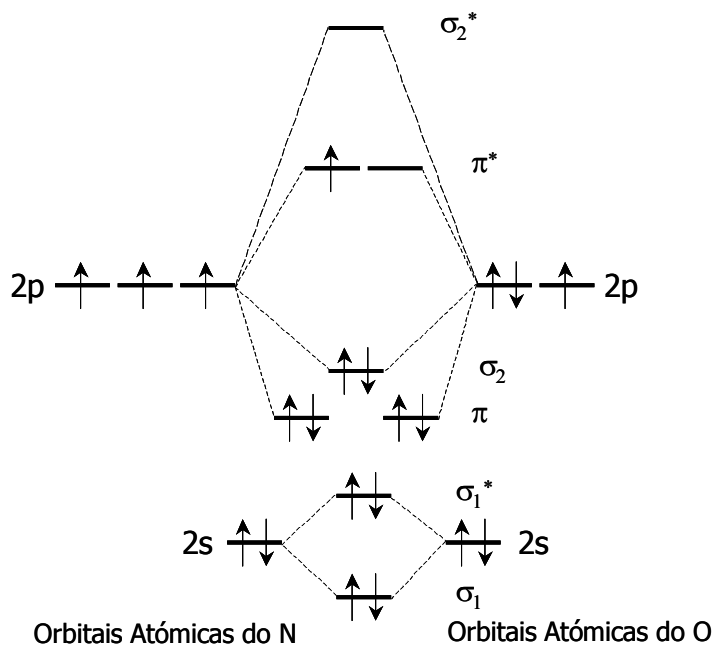
O NO em excesso é tóxico para bactérias, fungos, parasitas microbianos, células tumorais e vírus. Apesar de ser produzido pelas bactérias desnitrificantes durante o seu metabolismo é, também, tóxico para este grupo de bactérias.

O óxido nítrico é um radical livre, paramagnético, cujo electrão desemparelhado se encontra numa orbital  $\pi^*$ , de acordo com a teoria das Orbitais Moleculares (ver figura II.1.1.).

Esta configuração electrónica explica a sua elevada reactividade, particularmente a facilidade com que se oxida para originar o ião nitrosónio (NO<sup>+</sup>) ou se reduz para originar o ião nitróxido (NO<sup>-</sup>), este último isolelétrico com o oxigénio molecular. Esta relação faz com que o NO seja frequentemente usado como um modelo para o O<sub>2</sub> nos estudos de ligação a proteínas hémicas quando a análise da sua forma oxigenada se torna difícil ou mesmo impossível devido a instabilidade [3].

---

<sup>1</sup> Na nomenclatura IUPAC, a molécula NO é denominada monóxido de nitrogénio. No entanto, ao longo desta tese usar-se-á o nome convencional de óxido nítrico, uma vez que este é comum à grande maioria, se não à totalidade, dos artigos científicos sobre o tema da desnitrificação.



**Figura II.1.1.** Representação em diagrama das orbitais moleculares da configuração electrónica da molécula de NO. Adaptado de McCleverty [3].

### 1.1. O Papel do NO na Regulação da Pressão Sanguínea

Os trabalhos de investigação anteriores a 1981 que envolviam o NO, baseavam-se essencialmente na sua química não biológica, até que, quatro linhas de investigação independentes nos campos da toxicologia, imunologia, farmacologia cardiovascular e neurobiologia, revelaram o seu papel como mensageiro essencial aos sistemas biológicos. A descoberta de que o NO, produzido por uma célula, é capaz de transpor membranas e regular a função de outras células foi um princípio revolucionário que fez com que o Prémio Nobel da Medicina fosse atribuído em 1998 a Robert F. Furchgot, Louis J. Ignarro e Ferid Murad. Estes investigadores descobriram que a nitroglicerina, há muito usada no tratamento de doentes com problemas cardíacos, actua por libertação de NO. Esta molécula vai activar a enzima ciclase do guanilato que produz monofosfato cíclico de guanosina (cGMP), o segundo mais importante mensageiro celular, que por sua vez vai causar relaxação muscular e consequentemente dilatação dos vasos sanguíneos. Consegue-se, assim, aumentar o fornecimento de oxigénio em pacientes em que o fluxo sanguíneo se encontrava diminuído pela formação de placas nas artérias [4]. Na realidade, a regulação da pressão sanguínea nos mamíferos é conseguida através do controle rigoroso do nível de NO produzido nas células



do endotélio vascular, por enzimas denominadas sintetases do óxido nítrico (NOS). Mensageiros químicos como hormonas ou a acetilcolina ligam-se a receptores à superfície da célula, provocando uma abertura dos canais de cálcio, o que faz com que haja um aumento do fluxo deste ião para o interior da célula. O cálcio liga-se a uma enzima denominada calmodulina que vai activar a NOS. O NO formado nas células endoteliais difunde-se para o interior dos vasos sanguíneos e para os músculos que os sustentam. Nos vasos sanguíneos o NO reduz a agregação das plaquetas e a sua adesão às células do endotélio. Nos músculos lisos o NO activa a enzima ciclase do guanilato, cuja produção de cGMP diminui a quantidade de cálcio livre no músculo, o que provoca o seu relaxamento [2].

Pensa-se que o mecanismo principal através do qual o NO exerce o seu papel biológico de sinalizador poderá ser através da modulação de canais iónicos, incluindo os canais de cálcio [5].

Hoje em dia sabe-se que o NO actua em diversos sistemas do nosso organismo, sendo um recurso frequentemente usado na prática da medicina. A título de exemplo, uma elevada pressão arterial nos recém-nascidos pode ser tratada por inalação de NO [6].

## **1.2. O Papel do NO na Transmissão do Impulso Nervoso**

No sistema nervoso central, o NO é fundamental na transmissão dos impulsos nervosos usados para a formação da memória, para o processamento sensorial e na regulação do fluxo sanguíneo cerebral [7]. A produção de NO ao nível dos neurónios é despoletada quando um neurónio activado liberta os seus mensageiros químicos que interagem com os receptores específicos do neurónio vizinho para o activar, transmitindo o impulso nervoso. Esta interacção provoca a abertura de um canal que permite a entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  na célula, o qual, tal como na descrição do processo de dilatação dos vasos sanguíneos, se liga à enzima calmodulina, que activa a NOS. O NO formado vai, mais uma vez, activar a enzima ciclase do guanilato por ligação ao ferro do seu centro activo. Pode também difundir-se para a célula anterior e activar a enzima ciclase do guanilato dessa célula. Desta forma, o NO pode ser usado como um mensageiro retroactivo, importante nos processos de formação da memória. Existem células do sistema nervoso periférico que não respondem a outros neurotransmissores como a acetilcolina ou a norepinefrina, mas respondem à presença de NO. Este tipo de neurónios pode ser encontrado em diversos tecidos periféricos, como por exemplo nos sistemas cardiovascular, urogenital, respiratório e digestivo [2].

### 1.3. O Papel do NO nos Processos Oxidativos

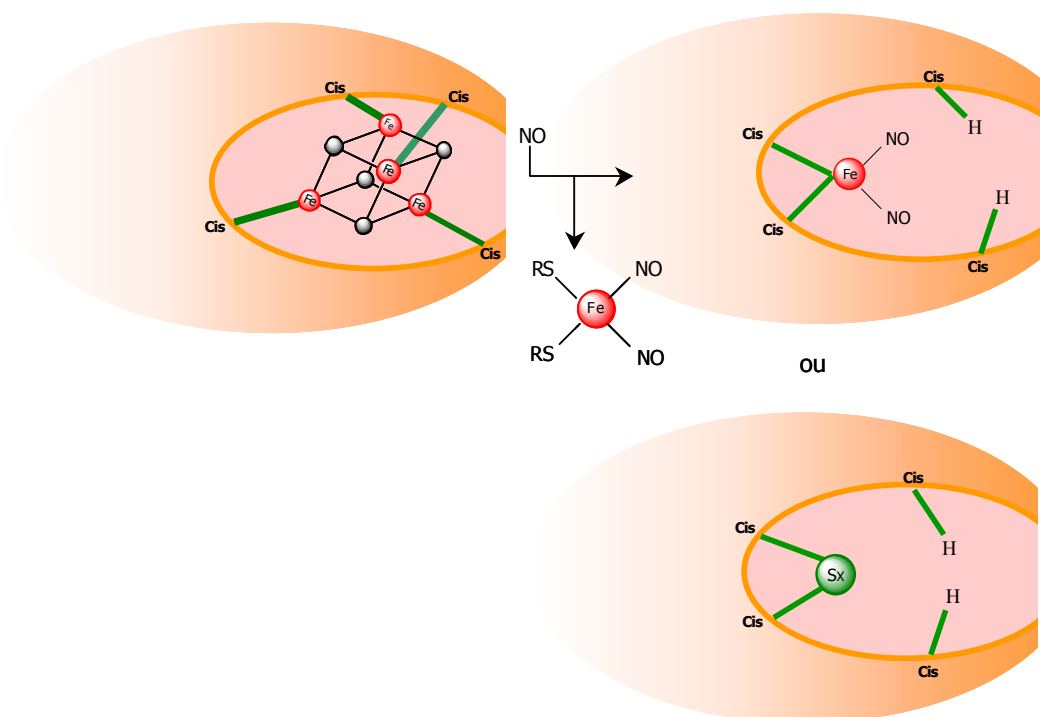
Na realidade, o papel do NO nos sistemas biológicos tem gerado alguma controvérsia por existirem evidências tanto do seu efeito inflamatório e destruidor, como do seu papel anti-inflamatório e anti-oxidante [8]. No sistema nervoso, o NO tanto exerce o efeito de sinalizador e transmissor do impulso nervoso, como provoca a morte dos neurónios através de um stress oxidativo gerado pelo excesso de NO e outras espécies de oxigénio activo (nomeadamente o  $\text{H}_2\text{O}_2$  e o  $\text{O}_2^-$ ) [9]. O NO pode, por um lado, reagir com radicais derivados de peróxidos, terminando a sua cadeia de propagação de reacções de oxidação celular [8]. Por outro lado, pode como dar origem ao peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ) por reacção com o radical superóxido ( $\text{O}_2^-$ ), o qual é bastante mais tóxico do que o NO ou o  $\text{O}_2^-$  originando um sem número de reacções de destruição celular como a peroxidação dos lípidos, inibição directa das enzimas respiratórias mitocondriais, inactivação dos canais de sódio membranares ou quebras na cadeia de ADN. A formação de peroxinitrito também está relacionada com o aparecimento de diversas formas de doença pulmonar provocadas por respiração de fibras de amianto, partículas derivadas da combustão da gasolina, e ozono, bem como a promoção e proliferação de tumores [10].

O NO é mutagénico, causando transições  $\text{C} \rightarrow \text{T}$ ,  $\text{AT} \rightarrow \text{GC}$  e  $\text{GC} \rightarrow \text{AT}$  em *Escherichia* (*E.*) *coli*. O efeito genotóxico do NO é complexo, podendo passar por inibição das enzimas de reparação do ADN, quebras na cadeia dupla e ligações cruzadas. Nenhum tipo de sistema de reparação do ADN consegue aguentar tanta reactividade, pelo que acabam por ocorrer danos ou morte celular [11].

### 1.4. O Papel do NO na Resposta Imunitária e na Citotoxicidade

No sistema imunitário, o papel do NO é bastante diferente das suas funções nos neurónios e nos vasos sanguíneos. Os macrófagos possuem uma sintetase do NO que, ao contrário das anteriormente referidas, não necessita de cálcio para se tornar activa. A sua síntese é induzida pela presença de diversas citocinas como o interferão- $\gamma$ , o factor de necrose tumoral ou as interleucinas. Um macrófago estimulado produz NO em grandes quantidades. Este difunde-se para as células vizinhas, onde reage com os centros ferro-enxofre de enzimas como a aconitase ou os complexos I e II da cadeia de transporte electrónico da respiração mitocondrial. O NO liga-se aos átomos de ferro removendo-os do centro ferro-enxofre e

produzindo derivados nitrosilo ferro-enxofre solúveis ou ligados à cadeia polipeptídica da proteína (ver figura II.1.2.). O NO produzido pelos macrófagos é usado para inibir a proliferação de células tumorais e para matar parasitas intracelulares. Também inibe a actividade catalítica da oxidase do citocromo *c* [12]. Este efeito reflecte, presumivelmente, uma homologia evolutiva entre esta enzima e a redutase do óxido nítrico, a qual será desenvolvida mais à frente, neste capítulo.



**Figura II.1.2.** Ataque do NO aos centros ferro enxofre das proteínas. Adaptado a partir de Feldman *et al.* [2].

No ataque a uma célula tumoral, o NO formado na célula do macrófago, difunde-se em todas as direcções. No entanto a proximidade do macrófago em relação à célula cancerígena assegura que uma grande quantidade do agente citotóxico penetre a célula alvo. Uma vez na célula cancerígena, o NO inibe diversos processos celulares, nomeadamente o ciclo dos ácidos tricarboxílicos, por inibição da enzima aconitase e a fosforilação oxidativa por inibição dos complexos I e II da cadeia de transporte electrónico, o que leva a uma diminuição da síntese de ATP. O NO inibe também a redutase dos ribonucleótidos, interferindo assim com a formação dos desoxirribonucleótidos necessários à síntese do ADN [2, 13].

No entanto, no que diz respeito ao cancro, estudos recentes revelaram que o papel do NO é “uma faca de dois gumes”. Foi detectada actividade de sintetase do NO nas células tumorais e pensa-se que a presença de NO pode estar associada ao desenvolvimento e proliferação de um tumor. Assim, se por um lado uma elevada concentração de NO nestas células tem o efeito acima descrito de inibição da proliferação das células, por outro a sua presença em baixas concentrações promove o crescimento dos tumores [14].

Os metabolitos reactivos do oxigénio como o ião superóxido, o peróxido de hidrogénio ou o radical hidroxilo também têm um papel importante na resposta imunitária. Estes são produzidos em grandes quantidades pelos leucócitos como um mecanismo de eliminar os agentes patogénicos, actuando também como mensageiros secundários na transdução do sinal inflamatório. No entanto, estes provocam danos nas células do endotélio vascular que levam a um aumento da sua permeabilidade e morte celular [13, 15].

### **1.5. O Papel do NO Noutros Processos de Sinalização**

O NO é um importante regulador durante o processo reprodutivo, nomeadamente ovulação, implantação, manutenção da gravidez e parto. O nível de NO é aumentado durante o desenvolvimento do folículo e diminuído logo após a ovulação. O NO também regula as funções do endométrio, nomeadamente a sua receptividade e a menstruação. Substâncias farmacêuticas que produzam NO podem ser usadas para promover a fertilidade. Perto do final de uma gravidez, a produção de NO diminui, promovendo as contracções que resultam no parto [16].

## **2. A Via Metabólica da Desnitrificação**

A desnitrificação é a redução dissimilativa do nitrato em produtos voláteis (azoto atmosférico e óxido nitroso) passando pelo nitrito como intermediário [17]. Esta via metabólica é usada por diversas bactérias encontradas no solo ou no mar como alternativa à respiração do oxigénio. Constitui uma parte importante do ciclo do azoto, revertendo a fixação deste elemento e formando o N<sub>2</sub> gasoso.

A importância do estudo deste processo tem a ver com vários factores [11, 17-19]:

- i) A desnitrificação é responsável pela maior parte das perdas do nutriente limitante para o crescimento das plantas.
- ii) Um dos produtos da desnitrificação é o óxido nitroso ( $N_2O^2$ ), o qual, juntamente com o dióxido de carbono e o metano, é um dos principais gases responsáveis pelo efeito de estufa. Além disso, o  $N_2O$  juntamente o  $NO$ , são dois dos maiores responsáveis pela destruição da camada de ozono atmosférica. O tempo de residência do  $N_2O$  na atmosfera está estimado em 150 anos.
- iii) A desnitrificação pode ser usada no tratamento de águas residuais (biorremediação), quer para libertar as águas outros poluentes (o nitrato e o nitrito são mais solúveis na água do que o oxigénio), como também para diminuir a quantidade de azoto disponível nas próprias águas, o qual acaba por se tornar um poluente importante das águas potáveis.
- iv) O estudo das enzimas da desnitrificação fornece modelos estruturais e espectroscópicos para as enzimas dos mamíferos que produzem e utilizam o  $NO$  nos processos de sinalização
- v) A descoberta das funções biológicas do  $NO$ , já exploradas neste capítulo, fez com que o estudo deste intermediário da desnitrificação recebesse uma atenção renovada.

## 2.1 O Ciclo do Azoto

O azoto está presente no ambiente que nos rodeia num grande número de estados de oxidação. A interconversão entre esses estados de oxidação é realizada predominantemente por via biológica, tal como se pode constatar no Ciclo do Azoto esquematizado na figura II.1.3.

O azoto é introduzido na biosfera através da fixação biológica e química do  $N_2$  (assimilação) e novamente devolvido à atmosfera através da desnitrificação. A desnitrificação engloba a transformação dissimilatória do nitrato e do nitrito em produtos gasosos com conservação de energia. No entanto, estes mesmos substratos podem ser reduzidos a amónia através de um processo assimilatório com fins biossintéticos. Os processos dissimilatórios abrangem ainda a amonificação. Este termo pode ser usado para

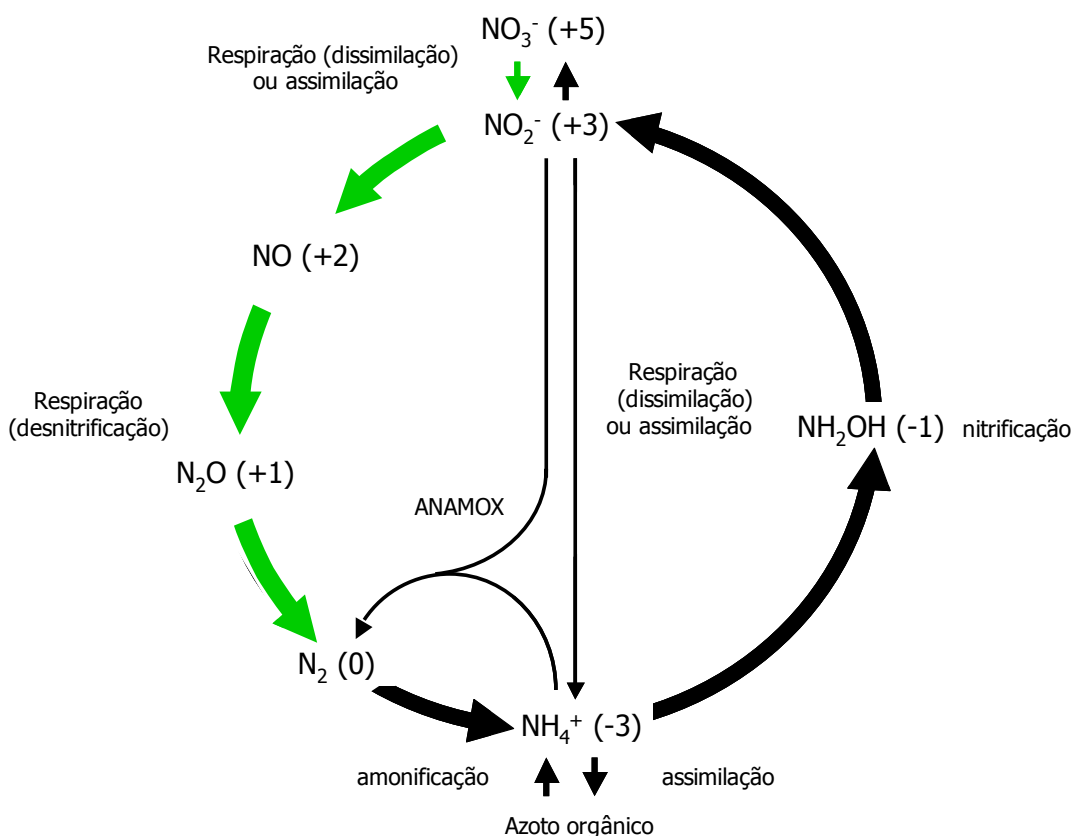
---

<sup>2</sup> A IUPAC recomenda o nome monóxido de nitrogénio para o  $N_2O$ , no entanto, ao longo desta tese será adoptado o nome convencional de óxido nitroso.

denominar a redução do nitrato a amónia, a libertação de amónia a partir de uma molécula orgânica ou a conversão de  $N_2$  atmosférico em amónia (fixação do  $N_2$ ).

Na figura II.1.3, pode-se verificar ainda a ocorrência de respiração com redução do nitrito a amónia, a qual é frequentemente usada por bactérias que possuem um metabolismo fermentativo; e da oxidação anaeróbia da amónia (ANAMOX), a reacção do ciclo do azoto mais recentemente descoberta, através da qual o nitrito e a amónia se combinam originando  $N_2$  e água. As bactérias que catalisam esta última reacção usam a amónia como doador electrónico e o nitrito como aceitador [20].

A oxidação da amónia a nitrito, tendo como intermediário hidroxilamina e a oxidação de nitrito a nitrato são ambos denominados por nitrificação. Apesar disso, nunca se verificou a co-existência destes dois processos numa mesma espécie bacteriana [21, 22].



**Figura II.1.3.** O Ciclo do Azoto. Os estados de oxidação do azoto em cada intermediário são apresentados entre parêntesis. ANAMOX significa oxidação anaeróbia da amónia. Os passos pertencentes à via da desnitrificação encontram-se destacados por setas a verde.

## 2.2. As Enzimas Envolvidas na Desnitrificação

As bactérias desnitrificantes podem ser encontradas numa grande variedade de habitats, incluindo o solo, a água e o tracto intestinal. Apesar destes organismos preferirem o oxigénio como aceitador electrónico, na sua ausência conseguem obter energia através do transporte electrónico acoplado à redução das espécies oxidadas de azoto ( $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NO}_2^-$ , NO e  $\text{N}_2\text{O}$ ). A energia libertada durante os processos de transporte electrónico é usada para levar a cabo a translocação de protões através da membrana citoplasmática, ou mitocondrial dando origem a um gradiente de protões ou força protomotriz. Esta é usada na síntese de ATP, a molécula energética por excelência, usada na maioria dos processos celulares [18, 23].

As enzimas envolvidas na desnitrificação são induzidas quando as condições se tornam anaeróbias, apesar da desnitrificação poder ocorrer na presença de oxigénio. Em alguns casos a indução pode até necessitar de oxigénio em baixas concentrações. A presença de nitrato ou outros óxidos de azoto nem sempre é necessária [24].

Os estudos em organismos nos quais existe co-respiração de oxigénio e de óxidos de azoto foram realizados predominantemente em *Thiosphaera pantotropha*. Nesta bactéria, à excepção da redutase do nitrato, todas as enzimas envolvidas na desnitrificação aeróbia são as mesmas envolvidas na desnitrificação anaeróbia [21].

Durante muitos anos a via da desnitrificação foi motivo de controvérsia por não se saber se o NO era um intermediário livre obrigatório deste processo. Pensava-se que a redutase do nitrito poderia reduzir o  $\text{NO}_2^-$  directamente a  $\text{N}_2\text{O}$ , sem intermediários livres. Em favor desta teoria estava o facto do NO ser bastante tóxico para as células, podendo inibir um grande número de metaloproteínas. Como consequência, a sua concentração intracelular é mantida em limites bastante estreitos (entre  $10^{-9}\text{M}$  e  $10^{-7}\text{M}$  [25]). O isolamento da redutase do óxido nítrico [26, 27] foi a prova definitiva de que o NO era um intermediário obrigatório da desnitrificação. No entanto muitas outras evidências eram já conhecidas:

- i) Em redutases do nitrito (NIR) hémicas puras podem observar-se por espectroscopia de RPE sinais típicos de complexos ferrocitocromo-NO [17].
- ii) As NIR's puras originam NO como produto principal da redução do  $\text{NO}_2^-$  [19, 28].
- iii) Mutantes que não produzem uma NIR funcional ( $\text{Nir}^-$ ) mantêm a capacidade de reduzir o NO a  $\text{N}_2\text{O}$  [29, 30].

- iv) Estudos de medição dos níveis de NO em condições de estado estacionário, e tentativas de aprisionamento deste composto demonstraram que possuía as características necessárias para ser considerado um intermediário cineticamente competente [31, 32].
- v) Mutantes que não produzem uma redutase do óxido nítrico funcional (Nor<sup>-</sup>) acumulam NO, sendo este fenótipo letal [33].
- vi) Estudos de marcação isotópica demonstraram haver formação de NO marcado isotopicamente quando se fornecia esta marcação no NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, resultados estes consistentes com um modelo em que o NO é um intermediário livremente difusível [34, 35].

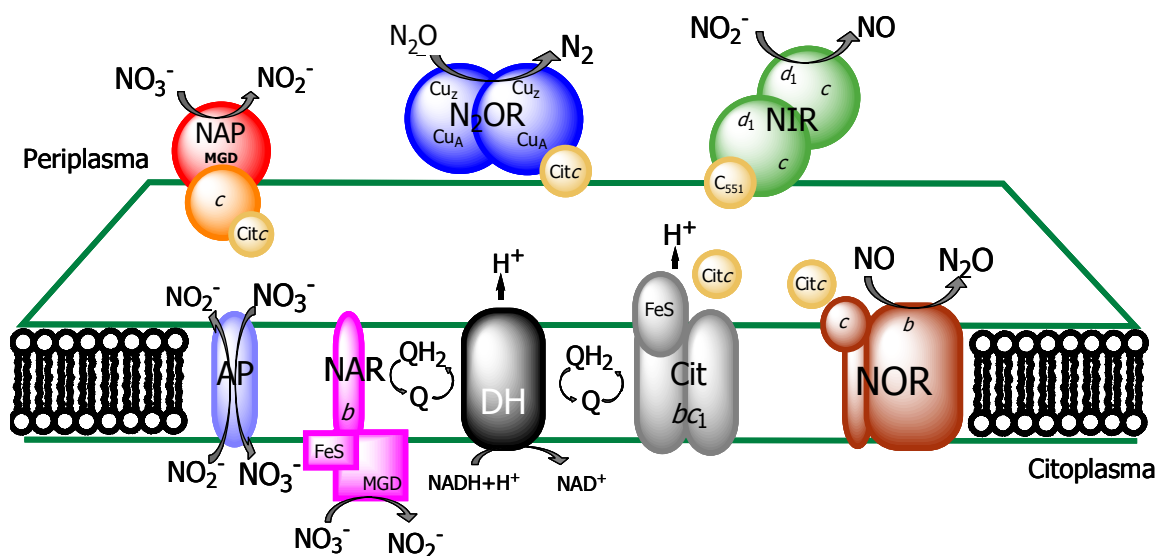
A concentração de NO durante a desnitrificação depende das condições do crescimento celular. Um pH baixo e condições de limitação de oxigénio favorecem a acumulação de NO, (efeito este nunca verificado em condições anaeróbias). Para manter as baixas concentrações intracelulares de NO, a enzima que o reduz deve possuir uma constante de afinidade muito elevada. Além disso, existem outros mecanismos para garantir a não acumulação intracelular de NO. As transformações de nitrito em NO e de NO em N<sub>2</sub>O são mais estreitamente reguladas do que qualquer outra reacção do processo da desnitrificação, de tal forma que se a redução do NO a N<sub>2</sub>O por algum motivo não ocorrer, a redução do nitrito a NO é inibida [11].

Na figura II.1.4. é apresentada a parte do ciclo do azoto correspondente à desnitrificação com as enzimas que catalisam cada reacção e na figura II.1.5. pode observar-se a organização da cadeia de transporte electrónico anaeróbia de *Ps. stutzeri*. As enzimas membranares são as redutases do nitrato e do óxido nítrico. Para além das enzimas envolvidas na desnitrificação, na figura II.1.5, podem ainda observar-se o citocromo *bc*<sub>1</sub>, e as desidrogenases, membranares, bem como citocromos e cupredoxinas solúveis. À excepção da redutase do nitrato e de alguns tipos de redutases do óxido nítrico, que recebem electrões directamente do quinol, todas as outras enzimas da desnitrificação recebem electrões de pequenos citocromos solúveis do tipo do citocromo *c*<sub>551</sub> de *Ps. stutzeri*, ou cupredoxinas, como a azurina. Estes, por sua vez, recebem electrões do citocromo *bc*<sub>1</sub>, o qual é reduzido pelo quinol.





**Figura II.1.4.** Representação esquemática da via metabólica da desnitrificação com a indicação das enzimas que catalisam cada reacção. NAR, redutase do nitrato; NIR, redutase do nitrito; NOR, redutase do óxido nítrico; N<sub>2</sub>OR, redutase do óxido nitroso.



**Figura II.1.5.** Organização da cadeia de transporte electrónico de *Ps. stutzeri*. Destacam-se os co-factores de cada proteína e os doadores electrónicos. As proteínas a preto e cinzento representam os componentes que também estão presentes na cadeia de respiração aeróbia: a desidrogenase do NADH (DH) e o complexo bc<sub>1</sub>. AP- transportador em sistema de antiporte de nitrato e nitrito.

### 2.2.1. A Redutase do Nitrato

A redutase do nitrato catalisa a redução do nitrato a nitrito. Existem quatro classes de redutases do nitrato: as bacterianas associadas à respiração do nitrato, com uma classe membranar e outra periplasmática, e as duas classes distintas de enzimas assimilatórias citoplasmáticas existentes em bactérias e eucariotas. As duas primeiras classes, as redutases do nitrato dissimilatórias (envolvidas no processo de respiração) podem ser distinguidas das duas últimas, associadas à redução assimilativa e fermentativa do nitrato, pelo produto final

da sua via metabólica: azoto atmosférico no caso das primeiras e amónia no caso das últimas (ver figura II.1.3).

Os quatro tipos de redutases do nitrato possuem co-factores de molibdénio no seu centro activo [21, 24, 36].

No que diz respeito aos dois tipos de enzimas respiratórias, a periplasmática (NAP) está associada à desnitrificação aeróbia, enquanto que a membrana (NAR) realiza o primeiro passo da desnitrificação anaeróbia. A NAR acopla a oxidação do quinol à geração de uma força electromotriz, o que não acontece no caso da NAP. Este último tipo de enzima parece estar associado à dissipação de excesso de redutores celulares. Durante o crescimento aeróbio numa fonte de carbono reduzido, este nutriente deve ser oxidado até a um nível em que possa ser assimilado. Se desta oxidação resultar a formação de mais redutor do que o necessário para a formação do ATP usado no metabolismo do carbono é essencial que exista um processo de dissipação do excesso de redutor. Caso contrário a velocidade de crescimento será abrandada até à taxa permitida pela reoxidação do NADH nas reacções de manutenção celular [22, 23].

### **2.2.2. A Redutase do Nitrito**

A redutase do nitrito (NIR), que reduz o nitrito a óxido nítrico, é considerada uma das enzimas chave da desnitrificação, uma vez que catalisa o primeiro passo que dá origem a um intermediário gasoso. Existem dois tipos de enzimas bem distintos que catalisam a reacção de redução do nitrito a óxido nítrico, tanto em termos de estrutura, como do centro activo. Cerca de 75% das estirpes bacterianas estudadas possuem uma enzima tetrahémica denominada citocromo *cd<sub>1</sub>*, enquanto que as restantes dispõem de uma enzima cujo centro activo contém cobre (CuNIR) [11]. Os dois tipos desempenham a mesma função, nunca se tendo verificado expressão de ambas no mesmo organismo.

As NIR's hémicas são enzimas solúveis, localizadas no periplasma bacteriano. São homodímeros de aproximadamente 120 kDa, contendo cada monómero um hemo *c* e um hemo *d<sub>1</sub>*. Na enzima de *Ps. stutzeri* o hemo *c* recebe electrões do citocromo *c<sub>551</sub>*, transferindo-os para o hemo *d<sub>1</sub>*, onde ocorre a redução do nitrito [37].

As CuNIR's, apesar de menos abundantes do que as NIR's hémicas, podem ser encontradas numa maior variedade de habitats. São proteínas homotriméricas, que possuem dois átomos de cobre por monómero.

Até recentemente pensava-se que o produto da redução do nitrito pelas NIR's poderia ser o  $N_2O$ . Experiências realizadas com CuNIR's puras apontavam para o  $N_2O$  como produto maioritário da catálise, quando ditionito ou corantes de viologénio eram usados como doadores electrónicos, e NO quando o sistema redutor era metassulfato de fenazina (PMS) e ascorbato de sódio. Na realidade, a produção de  $N_2O$ , no caso do uso de um sistema redutor mais forte como o ditionito de sódio, deve-se à posterior redução química do NO obtido da redução enzimática do nitrito [24].

Uma última classe de redutases de nitrito multihémicas catalisa a reacção de redução de seis electrões do nitrito a amónia [36].

### 2.2.3. A Redutase do Óxido Nítrico

A redutase do óxido nítrico (NOR) foi a última enzima desta via metabólica a ser isolada. É uma enzima membranar, pelo que a sua obtenção numa forma activa e pura é difícil e bastante dispendiosa (devido aos detergentes que têm que ser usados como forma de manter a sua estabilidade). É a única enzima da desnitrificação cuja estrutura tridimensional é desconhecida. No entanto, o conhecimento da sua sequência de aminoácidos e a modelação da sua estrutura secundária, revelaram semelhanças com a família das oxidases hemo-cobre, à qual pertence a maioria das oxidases terminais das cadeias de transporte electrónico aeróbias.

As primeiras redutases do óxido nítrico que foram isoladas (a partir das bactérias *Ps. stutzeri* [26] e *Pa. denitrificans* [27, 38, 39]) são constituídas por duas subunidades. Uma subunidade membranar com cerca de 53 kDa que contém hemo *b* e ferro não hémico (NORB), e uma subunidade com cerca de 17 kDa que contém um hemo *c* (NORC).

A superfamília das oxidases hemo-cobre, bem como as redutases do óxido nítrico, a ela pertencentes serão descritas em mais pormenor nas próximas secções.

### 2.2.4. A Redutase do Óxido Nitroso

A redutase do óxido nitroso ( $N_2OR$ ) é uma enzima homodimérica que catalisa o último passo da desnitrificação, a redução envolvendo dois electrões, do NO a  $N_2O$ . Os seus co-factores são constituídos por átomos de cobre agrupados em dois centros: o  $Cu_A$ , um centro binuclear semelhante ao encontrado nas oxidases do citocromo *c* e o  $Cu_Z$ , o centro catalítico

que até recentemente se pensava ser também constituído por dois átomos de cobre. A determinação da estrutura tridimensional da N<sub>2</sub>OR isolada da bactéria *Ps. nautica* [40], através da técnica de Cristalografia de Raios-X, revelou um centro catalítico com quatro átomos de cobre dispostos numa geometria tetraédrica distorcida, apenas com histidinas como ligandos, um arranjo nunca antes observado em moléculas biológicas e sem precedentes em termos da química de coordenação do cobre [36, 41].

### 3. A Superfamília das Oxidases Hemo-Cobre

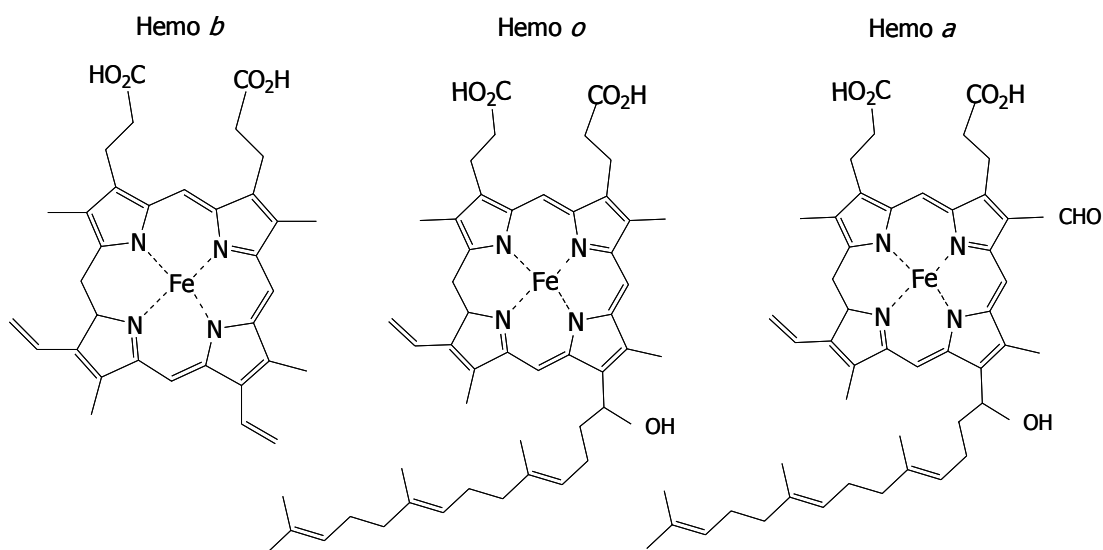
A família das oxidases hemo-cobre (HCO) é bastante diversificada em termos de doadores electrónicos, composição em subunidades e tipos de hemo. Esta família é classicamente definida pela presença da subunidade I contendo um hemo hexacoordenado em configuração de spin baixo e um centro bimetalico único (que lhe deu o nome), composto por um hemo em configuração de spin alto e um íon de cobre, Cu<sub>B</sub> [42].

As HCO catalisam a redução do O<sub>2</sub> a H<sub>2</sub>O. As bactérias aeróbias possuem geralmente uma grande quantidade de oxidases respiratórias. Estas permitem à célula adaptar o seu sistema respiratório às condições ambientais. Assim, em condições de baixa concentração de oxigénio, as bactérias expressam uma oxidase terminal com maior afinidade, que pode ser o citocromo *bd* em *E. coli*, ou o citocromo *cbb<sub>3</sub>* em *Pa. denitrificans* [43]. Alguns microrganismos expressam oxidases terminais não pertencentes à família das HCO, no entanto, a ocorrência destas últimas parece ser universal entre as bactérias. Das oxidase terminais não pertencentes à família das HCO, a melhor caracterizada é a oxidase do quinol do tipo *bd* [44].

Quando a estrutura primária da NOR de *Ps. stutzeri* foi determinada, realizou-se um modelo topológico da enzima. De acordo com esta previsão estrutural, a subunidade *b* da NOR consiste em 12 hélices transmembranares, enquanto que a subunidade *c* possui um domínio periplasmático onde se liga o hemo *c*, ancorado à membrana por uma hélice da zona N-terminal. A procura de homologia da sequência de aminoácidos com a de outras proteínas das bases de dados não foi bem sucedida. No entanto, verificou-se que o modelo topológico da NOR apresentava uma grande semelhança com duas das subunidades das oxidases terminais hemo-cobre, nomeadamente com as oxidases do citocromo *c* do tipo *cbb<sub>3</sub>* [45]. Tendo em conta as semelhanças, criou-se uma superfamília das HCO com uma definição alargada, de forma a incluir as redutases do óxido nítrico. Assim, esta superfamília pode ser identificada pela presença da subunidade I, uma subunidade membranaar que contém um hemo envolvido na transferência electrónica, e um centro binuclear, com um

hemo em configuração de spin alto, onde ocorre a catálise. Dentro da superfamília das HCO existem dois grupos distintos: o das oxidases terminais e o das redutases do óxido nítrico [46].

A maior variação existente no grupo das oxidases terminais, advém do facto de estas possuírem diferentes combinações de hemos associados à subunidade I membranar. A oxidase mitocondrial, por exemplo, possui dois hemos do tipo *a*, sendo referida como oxidase *aa<sub>3</sub>*<sup>3</sup>. No entanto, é possível encontrar hemos do tipo *b*, *o* ou *a* no centro catalítico binuclear, enquanto que apenas hemos *b* ou *a* podem constituir o hemo hexacoordenado de transferência electrónica [44]. As estruturas dos hemos *b*, *o*, *a* e *c* podem ser observadas na figura II.1.6.

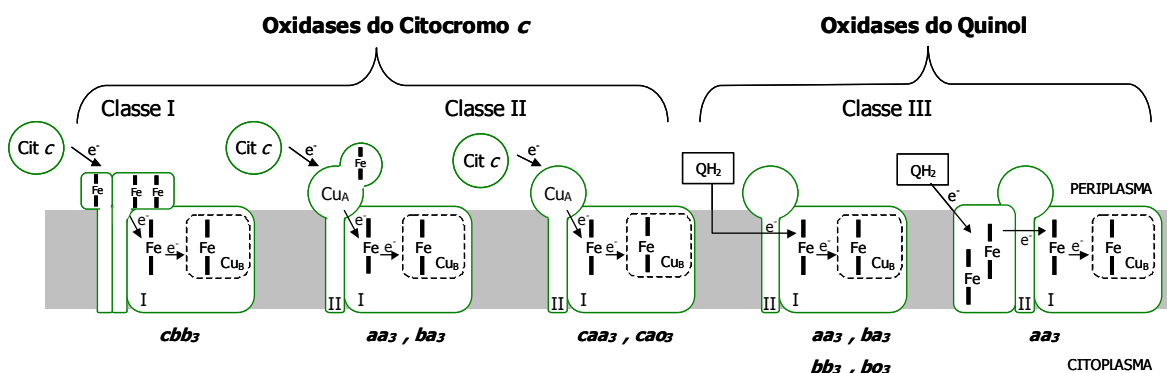


**Figura II.1.6.** Estrutura dos hemos *b*, *o* e *a*. São hemos que se não se encontram covalentemente ligados à cadeia polipeptídica das proteínas, variando apenas nos grupos laterais do anel porfirínico.

O grupo das oxidases terminais pode ser dividido em dois grandes sub-grupos, de acordo com o doador electrónico. Assim, temos as oxidases do citocromo *c* e as oxidases do

<sup>3</sup> Por razões históricas, o índice 3 é usado para identificar o hemo que liga o O<sub>2</sub> nas oxidases terminais, ou seja, o hemo que possui uma configuração de spin alto. Por analogia com estas enzimas, a mesma terminologia foi adoptada para a NOR.

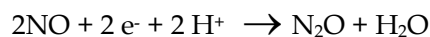
quinol. As primeiras recebem electrões de um citocromo  $c$  solúvel, o qual é por sua vez reduzido pelo citocromo  $bc_1$ , que usa quinol como fonte de electrões. As segundas recebem electrões directamente do quinol. As oxidases do quinol são estruturalmente muito semelhantes às oxidases do citocromo  $c$ , mas possuem um local de ligação da quinona na subunidade I, o qual não está presente no grupo anterior [47]. Além disso, ao contrário das oxidases do quinol, as oxidases do citocromo  $c$  (à excepção da oxidase do tipo citocromo  $ccb_3$ ) possuem um centro binuclear de cobre ( $Cu_A$ ) na sua subunidade II. Pensa-se que as oxidases do quinol evoluíram a partir das oxidases do citocromo  $c$  por perda do  $Cu_A$  [48]. Na figura II.1.7. podem ser observados os vários tipos de oxidases terminais do tipo hemo-cobre, divididas de acordo com o doador electrónico. Dentro de cada divisão podem ainda ser observadas as diferentes composições em termos de co-factores presentes na subunidade II ou nas subunidades divergentes da oxidase do tipo  $ccb_3$ . Esta última possui mais duas subunidades para além da subunidade I, contendo uma delas um hemo do tipo  $c$  e a outra dois hemos do tipo  $c$ .



**Figura II.1.7.** Representação esquemática dos cinco tipos de HCO terminais. Adaptado a partir de Garcia-Horsman *et al.* [44].

#### 4. As Redutases do Óxido Nítrico

A redutase do óxido nítrico catalisa a reacção de redução do NO a N<sub>2</sub>O de acordo com a seguinte equação:



Esta é uma das reacções mais importantes da desnitrificação e cujo mecanismo tem gerado mais especulação, por incluir a formação da ligação N-N.

Apesar das suas semelhanças com as oxidases do citocromo *c*, a NOR não é uma bomba de prótons. Caso o fosse, isso justificaria a sua natureza membranar. No entanto, esta poderá ser explicada por um papel protector, que impede o NO facilmente difusível, de atingir o citoplasma e aí atacar proteínas e lípidos.

Diversos microrganismos não desnitrificantes expressam uma redutase do óxido nítrico. Nestas bactérias a função da NOR deverá ser apenas protectora e não respiratória. De facto, muitos microrganismos patogénicos possuem uma NOR com o intuito de se protegerem dos elevados níveis de NO produzidos pelo sistema imunitário [23].

#### 4.1. Diferentes Classes de Redutases do Óxido Nítrico

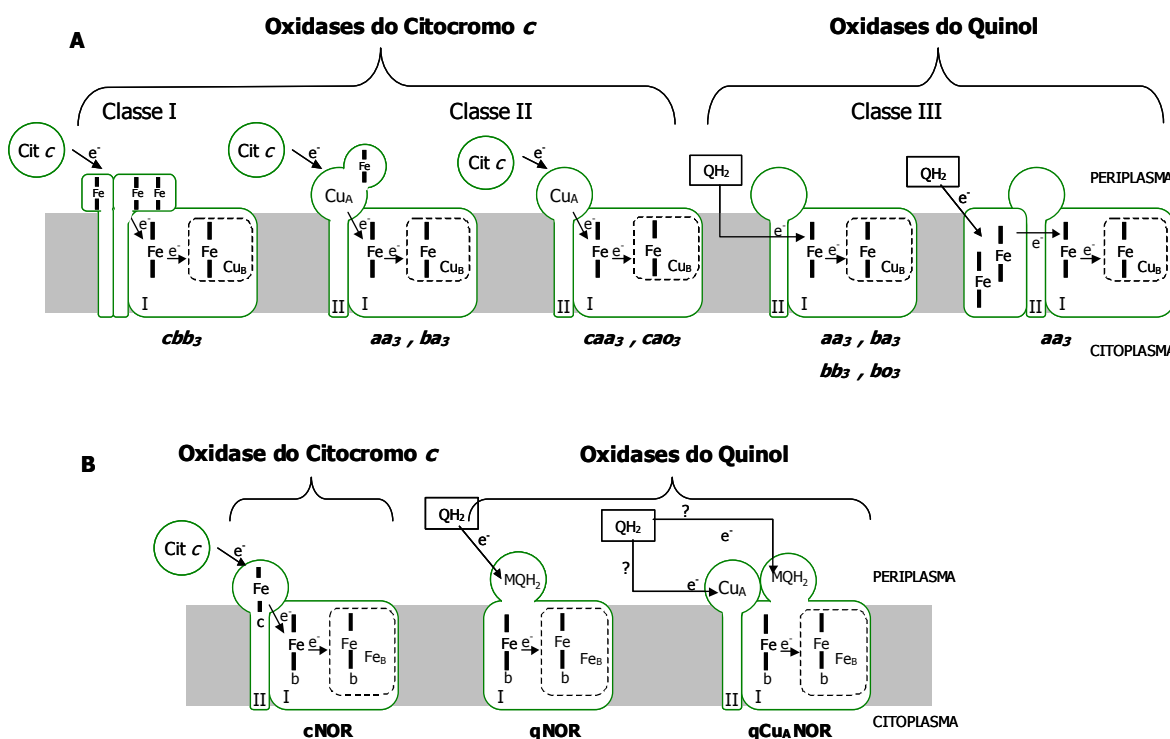
Conhecem-se três classes de NOR's. Todas são membranares e possuem um centro binuclear constituído por um hemo em configuração de spin alto e um ferro não hémico.

As primeiras a ser isoladas e aquelas cuja caracterização foi realizada de uma forma mais completa até ao momento são citocromos do tipo *bc* e pertencem a uma classe denominada cNOR. As enzimas pertencentes a esta classe são constituídas por duas subunidades e recebem electrões de citocromos solúveis do tipo *c* ou de cupredoxinas (ver figura II.1.9). Foram isoladas de bactérias Gram negativas, desnitrificantes como *Pa. denitrificans* [49, 50].

As restantes classes da NOR são oxidases do quinol. Uma delas, denominada qNOR é constituída por apenas uma subunidade e não possui hemo do tipo *c*. Está presente em bactérias marinhas, do solo, patogénicas e mesmo nas arqueobactérias.

A terceira classe foi isolada de uma bactéria Gram positiva, *Bacillus azotoformans* e é constituída por pelo menos duas subunidades em que, à semelhança das oxidases terminais a subunidade menor contém um centro Cu<sub>A</sub>. É denominada qCuNOR.

Na figura II.1.8 podem-se observar representações esquemáticas de cada uma das classes da NOR e compará-las com as classes de oxidases terminais HCO já anteriormente apresentadas na figura II.1.7. Através da observação da figura II.1.8, pode verificar-se a grande semelhança entre a qNOR e as enzimas da classe III do tipo *aa<sub>3</sub>* ou *ba<sub>3</sub>*, por exemplo, enquanto que a cNOR se assemelha mais às oxidases da classe I. A maior diferença entre as três classes da NOR é o local de aceitação de electrões a partir do doador externo: um citocromo *c* no caso da cNOR, um centro Cu<sub>A</sub> na qCuNOR, e um local de ligação de quinol na qNOR.



**Figura II.1.8.** Representação esquemática da superfamília das oxidases hemo-cobre. **A.** Os cinco tipos de HCO terminais. **B.** As três classes da NOR. MQH<sub>2</sub> representa um possível local de ligação do quinol. Na qCu<sub>A</sub>NOR são apresentadas as duas vias possíveis para a transferência electrónica a partir do quinol.

#### 4.1.1. cNOR

As primeiras redutases do óxido nítrico que foram isoladas de microrganismos como *Ps. stutzeri* [51], *Pa. denitrificans* [27, 52] e *Pa. haloenitrificans* [53] são constituídas por duas subunidades, a NORB, integralmente membranar, com um peso molecular de cerca de 53 kDa (deduzido a partir da sequência de aminoácidos) e a NORC, uma subunidade com 17 kDa, constituída por um domínio periplasmático e uma “âncora” membranar. A elevada hidrofobicidade da NORB faz com que esta migre de uma forma anormal num gel de poliacrilamida desnaturante, apresentando um peso molecular entre 34 kDa e 38 kDa. Provavelmente esta subunidade liga mais moléculas de SDS do que as restantes proteínas ou não desnatura totalmente nestas condições, o que faz com que aparente um peso molecular menor do que aquele que na realidade possui.

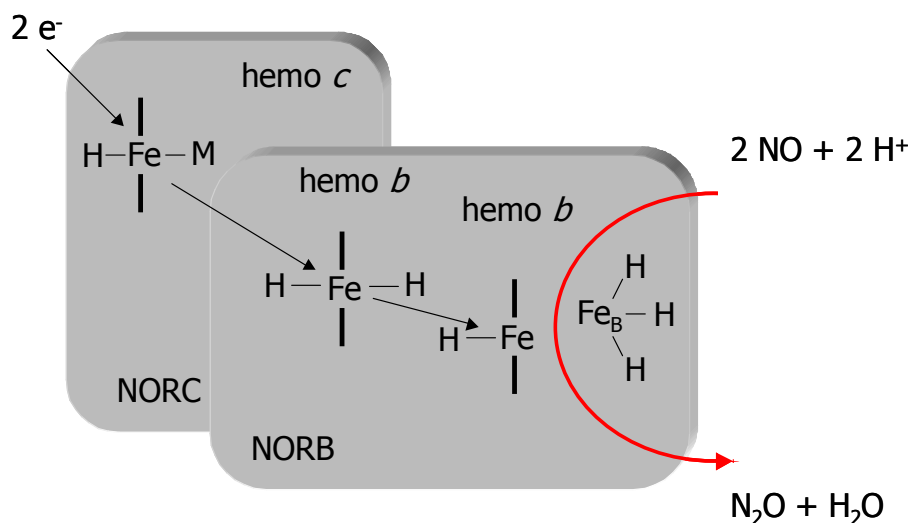
Estudos de ultracentrifugação com a NOR de *Pa. denitrificans* para determinar a estequiometria em termos de subunidades parecem apontar para um equilíbrio entre uma



composição  $\alpha_2\beta_2$  e  $\alpha\beta$ . No entanto, a presença de detergente nos agregados dificulta a determinação do peso molecular de uma forma exacta, pelo que a composição do complexo formado na membrana nativa é ainda desconhecido [54].

A subunidade NORB contém hemo *b* e ferro não hémico numa proporção de 2:1. A NORC possui apenas um hemo do tipo *c* e está, provavelmente, envolvida na transferência electrónica a partir do doador externo para o hemo *b* em configuração de spin baixo da NORB. Deste hemo os electrões são transferidos ao centro binuclear constituído pelo outro hemo *b* e pelo ferro não hémico,  $\text{Fe}_B^4$ . A cNOR recebe electrões de citocromos *c* solúveis e possivelmente também de cupredoxinas.

Por analogia com a oxidases do citocromo *c*, propôs-se uma coordenação axial histidina-histidina para o hemo *b* de transferência electrónica, enquanto que para o segundo hemo *b* foi sugerida uma coordenação por apenas uma histidina. A figura II.1.9 apresenta um esquema dos co-factores presentes na cNOR e do sentido previsto para a transferência electrónica durante a catálise.



**Figura II.1.9.** Esquema da cNOR evidenciando os co-factores que a constituem e o sentido previsto para a transferência electrónica entre estes. Adaptado a partir de Moënne- Loccoz *et al.* [55]

<sup>4</sup> Por analogia com o  $\text{Cu}_B$  das HCO, o ferro não hémico foi denominado  $\text{Fe}_B$ .

Análises de comparação de sequências de aminoácidos de diferentes proteínas revelaram que a subunidade NORC não apresenta homologia (excepto na zona de ligação ao hemo) com nenhum outro citocromo membranar ou ancorado à membrana.

Os potenciais formais de oxidação-redução de cada co-factor da NOR de *Pa. denitrificans* foram determinados por titulação redox acoplada à espectroscopia de UV/visível. Tendo em conta a discrepância do potencial formal de oxidação-redução do hemo  $b_3$  em relação aos restantes, é possível isolar uma forma da enzima em que apenas este hemo se encontra no estado oxidado (ver tabela II.1.1). Este estado de redução será denominado por estado de valência mista.

Na tabela II.1.1. encontram-se resumidas algumas propriedades bioquímicas das cNOR.

**Tabela II.1.1.** Propriedades bioquímicas das cNOR's purificadas até à data.

Bactéria	Peso Molecular das Subunidades (kDa)		Potenciais Formais de Oxidação-Redução (mV)				Ref <sup>a</sup>
	SDS-PAGE	Sequência Aminoácidos	Hemo c	Hemo b	Hemo $b_3^5$	Fe <sub>B</sub>	
<i>Ps. stutzeri</i>	17, 38	16.5, 53.0	+280	+322	—	—	[51]
<i>Pa. denitrificans</i>	17, 37	17.0, 52.5	+310	+345	+60	+320	[50, 56]
<i>Pa. halodenitrificans</i>	20, 42	—	—	—	—	—	[53]

#### 4.1.1.1. Os Genes que Codificam para a cNOR

O gene *norC* está sempre localizado a montante do gene *norB*, fazendo ambos parte de um operão que contém, no total, seis genes: *norCBQDEF*. Existem especulações de que dois destes genes, *norE* e *norF* poderão codificar para duas subunidades extra da cNOR. O produto do gene *norE* parece ser homólogo à subunidade III das oxidases do citocromo *c* do tipo *aa<sub>3</sub>* e *norF* parece codificar para uma pequena proteína com duas hélices transmembranares. No entanto, se tal for o caso, estas são separadas durante a extracção com

<sup>5</sup> Por analogia com as oxidases terminais o hemo  $b_3$  é o hemo do centro catalítico binuclear.

detergentes e a sua função é desconhecida. Mutações nos genes *norC*, *norB*, *norQ* e *norD* deram origem a células incapazes de crescer em condições anaeróbias, não se detectando actividade de NOR. Os mutantes *norQ*<sup>-</sup> e *norD*<sup>-</sup> apresentam nível reduzido de expressão da subunidade NORC. Mutações nos genes *norE* e *norF* resultam numa NOR com actividade reduzida apesar de manter o nível de expressão de NORC equivalente ao da estirpe original, o que sugere a sua importância na estabilidade ou agregação da NOR. Nas oxidases do citocromo *c* do tipo aa<sub>3</sub>, a subunidade III tem como função a catálise da agregação das subunidades I e II, de forma a constituírem um complexo activo [57].

#### 4.1.1.2. Propriedades Espectroscópicas

O espectro de UV/visível da cNOR nativa apresenta máximos a cerca de 411 nm<sup>6</sup> e 525 nm, 557 nm e uma banda de fraca intensidade a 595 nm. Após redução com ditionito de sódio, o máximo da banda do *soret* é deslocado para 420 nm e tornam-se visíveis as bandas  $\alpha$  e  $\beta$ . A banda  $\alpha$  apresenta um máximo a 551 nm devido ao hemo *c* e um ombro a 559 nm que corresponde ao hemo *b* em configuração de spin baixo. A banda  $\beta$  apresenta um máximo a cerca de 523 nm. A banda com fraca intensidade presente no espectro da forma oxidada a 595 nm desaparece com a redução e foi atribuída ao hemo *b* em configuração de spin alto [50].

No espectro de RPE da forma oxidada da cNOR são visíveis dois conjuntos de sinais correspondentes a hemos em configuração de spin baixo, com valores de  $g_{\text{máx}}=2.99$ ,  $g_{\text{med}}=2.25$  e  $g_{\text{min}}=1.44$  e de  $g_{\text{máx}}=3.54$ . A atribuição destes sinais foi de início algo controversa, mas a clonagem e caracterização da subunidade NORC de enzima de *Pa. denitrificans* veio confirmar a atribuição do sinal fortemente anisotrópico com  $g_{\text{máx}}=3.54$  ao hemo *c* desta subunidade [58]. Este hemo encontra-se em configuração de spin baixo, hexacoordenado, tendo como ligandos axiais uma metionina e uma histidina. O outro conjunto de valores com  $g_{\text{máx}}=2.99$ ,  $g_{\text{med}}=2.25$  e  $g_{\text{min}}=1.44$ , corresponde ao hemo *b* em configuração de spin baixo, coordenado axialmente por duas histidinas. Neste espectro são ainda geralmente visíveis, sinais com valores de  $g=6$  e  $g=2$ . O primeiro é típico de hemos em configuração de spin alto, no entanto quantificações de spin revelaram que corresponde a menos de 1% da concentração da enzima. O segundo foi atribuído por alguns autores ao ferro não hémico. No

---

<sup>6</sup> Os valores dos comprimentos de onda apresentados para os máximos das bandas no espectro de UV/visível referem maioritariamente à NOR de *Pa. denitrificans*.

entanto, a sua intensidade depende das preparações, estando mesmo ausente nalguns casos [50, 54, 59].

A redução da NOR com ditionito de sódio faz com que todos os sinais anteriormente observados no espectro de RPE da forma oxidada deixem de ser visíveis.

A incubação com NO, da NOR de *Pa. denitrificans* no estado reduzido, provoca o aparecimento no espectro de RPE, de dois conjuntos de sinais com  $g=4$  e  $g=2$ . O primeiro conjunto de sinais tem duas componentes com valores de  $g=4.11$  e  $g=3.95$  e foi atribuído a um complexo Fe(III) — NO com  $S=3/2$ , no qual o Fe em configuração de spin alto ( $S=5/2$ ) se encontra antiferromagneticamente acoplado a  $\text{NO}^-$  ( $S=1$ ) [50].

No espectro de RPE da NOR de *Pa. halodenitrificans* reduzida e incubada com NO, foi reportado um tripleto, centrado a  $g=2$ , típico de um hemo pentacoordenado no estado ferroso, ligado a NO, o qual foi atribuído a uma forma desnaturada da enzima [60].

Estudos de espectroscopia de Dicroísmo Magnético Circular (MCD) demonstraram que à temperatura do hélio líquido os três hemos se apresentam em configuração de spin baixo. Existe, assim, uma transição de spin dependente da temperatura no hemo  $b_3$  na qual este passa de uma configuração 100% spin alto para 100% spin baixo com a diminuição da temperatura [61].

As características espectroscópicas das cNOR isoladas de diferentes microrganismos encontram-se resumidas na tabela II.1.2.

**Tabela II.1.2.** Propriedades espectroscópicas das cNOR's conhecidas

Bactéria	Espectroscopia de UV/visível Máximos de Absorção (nm)		Espectroscopia de RPE <sup>a</sup> Valores de g				Ref.
	Nativa	Reduzida	Nativa			Reduzida e Incubada com NO	
			Hemo c	Hemo b spin baixo	Sinais spin alto <sup>b</sup>		
<i>Ps. stutzeri</i>	412, 537, 592	420, 522, 552 (ombro-560)	3.54	2.97, 2.25, 1.14	6.0	Tripleto a 2.01	[26, 51, 61, 62]
<i>Pa. denitrificans</i>	411, 525, 557, 595	420, 523, 551 (ombro-559)	3.53	2.99, 2.28, 1.46	[5.8-6.0]	4.11, 3.95, 2.0	[49, 50, 52, 54, 58]
<i>Pa. halodenitrificans</i>	410, 526, 560, 595	419, 522, 552 (ombro-560)	3.59 <sup>c</sup>	2.96, 2.26, 1.46	6.0, 6.6	4.1, 2	[53, 60]

<sup>a</sup> O centro binuclear constituído pelo hemo *b* em configuração de spin alto e pelo ferro não hémico não são visíveis em RPE. Embora alguns autores tenham tentado atribuir alguns sinais a  $g=2$  ou  $g=4.3$  ao ferro não hémico, estes não são mencionados na tabela.

<sup>b</sup> Os sinais correspondentes a hemos em configuração de spin alto são sempre pouco intensos e correspondentes apenas a uma muito pequena percentagem de spins.

<sup>c</sup> Aquando das primeiras purificações de cNOR's os valores de  $g$  atribuídos ao hemo *c* são aqueles que mais tarde se verificou corresponderem ao hemo *b* em configuração de spin baixo e vice-versa. No entanto, estudos posteriores permitiram verificar que a primeira atribuição de sinais no espectro de RPE da forma nativa não estava correcta. Não existe nenhum artigo recente sobre RPE da NOR de *Pa. halodenitrificans*, pelo que a atribuição dos sinais aos hemos não foi rectificada para esta enzima. Apesar disso os valores indicados na tabela estão corrigidos de acordo com os estudos mais recentes nas restantes NOR's.

#### 4.1.1.3. A Estrutura do Centro Activo. Mecanismo catalítico

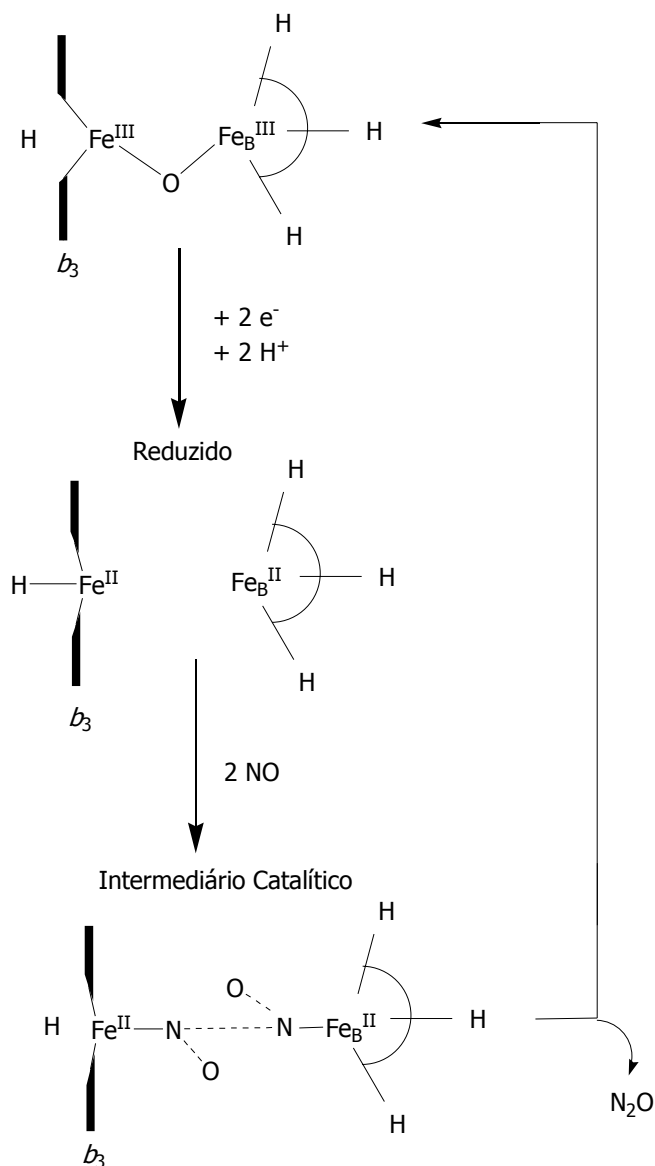
Para justificar o facto de tanto o hemo  $b_3$  como o  $\text{Fe}_B$  do centro binuclear não serem detectadas por espectroscopia de RPE, foi proposto que na forma oxidada da enzima os dois centros se encontram antiferromagneticamente acoplados através de uma ponte  $\mu$ -oxo. Neste estado de oxidação o hemo  $b_3$  do centro binuclear encontra-se pentacoordenado.

Estudos de espectroscopia de Ressonância de Raman indicaram que no estado totalmente reduzido da NOR, o hemo  $b$  em configuração de spin baixo, se encontra hexacoordenado. O hemo  $b_3$  encontra-se pentacoordenado, sendo o ligando axial, neste estado de oxidação da enzima, uma histidina.

Como forma de conciliar as observações realizadas através da aplicação de diferentes tipos de espectroscopia, foi proposto um modelo para o centro activo, em que na forma oxidada o hemo  $b_3$  tem como ligando axial apenas o oxigénio em ponte entre este hemo e o  $\text{Fe}_B$ . Este é o estado inactivo de descanso da enzima. Quando a enzima é reduzida o hemo  $b_3$  liga-se a uma histidina, perdendo o oxigénio em ponte que ocupava a outra posição axial, o que faz com que se mantenha pentacoordenado (ver figura II.1.10) [59].

Diversos mecanismos catalíticos têm sido propostos para a reacção de redução do NO a  $\text{N}_2\text{O}$ . O mecanismo que reúne maior consenso encontra-se esquematizado na figura II.1.10. Neste mecanismo, proposto por Moënne- Loccoz *et al.* [55, 59], duas moléculas de NO ligam-se simultâneamente ao centro activo da enzima no seu estado reduzido, cada uma a um dos átomos de ferro. A ligação do substrato faz com que haja quebra da ligação do hemo  $b_3$  à histidina axial, formando-se o intermediário representado na figura II.1.10. A proximidade entre os dois grupos nitrosilo desestabiliza a espécie  $\text{Fe}-\text{NO}$ , normalmente pouco reactiva, e promove a formação da ligação N-N. Após a dimerização, as moléculas de NO são reduzidas a  $\text{N}_2\text{O}$ , através dos electrões disponíveis em ambos os centros metálicos. A libertação do produto permite a formação de uma ponte  $\mu$ -oxo, completando o ciclo catalítico.

Num mecanismo alternativo proposto por Grönberg *et al.* [56], o centro binuclear existe num estado de valência mista (hemo  $b_3$  (III) /  $\text{Fe}$  (II)) antes da ligação das moléculas de NO. Estes autores propuseram que duas moléculas de NO se ligam sequencialmente ao ferro não hémico. No entanto, neste caso, não existe qualquer justificação para a presença do hemo  $b$  no centro binuclear para além do papel de transferência electrónica.



**Figura II.1.10.** Provável ciclo catalítico da NOR. Adaptado a partir de Moënne-Loccoz *et al.* [55].

A discrepância do potencial formal de oxidação-redução do hemo  $b_3$  em relação aos restantes fez com que se avançasse a possibilidade de que em condições fisiológicas a enzima existe num estado de valência mista em que os hemos  $c$  e  $b$  de spin baixo e o  $\text{Fe}_B$  se encontram reduzidos e apenas o hemo  $b_3$  se encontra no estado férrico. Num terceiro mecanismo proposto por Pinakoulaki, a ligação de uma molécula de  $\text{NO}$  ao hemo  $b_3$  seguida de uma redução de dois electrões dá origem à espécie  $\text{Fe}(\text{II})-\text{NO}^-$ . Nesta altura, uma segunda molécula de  $\text{NO}$  ataca o átomo de azoto dando origem a um intermediário

hiponitrito (HONNO<sup>-</sup>) com a consequente formação da ligação N-N. A libertação do produto regenera a enzima oxidada [63].

Estudos de incubação com CO, permitiram verificar que este apenas se liga às formas totalmente reduzida e de valência mista [64]. No estado oxidado a enzima parece estar numa conformação fechada devida à ponte  $\mu$ -oxo, que impede o acesso a ligandos externos e consequentemente ao substrato.

Por espectroscopia de ressonância de Raman, verificou-se que na forma de valência mista da NOR, o hemo  $b_3$  se encontra hexacoordenado com uma histidina e OH como ligandos axiais [65]. Estudos recentes de ligação de cianeto às formas oxidada, reduzida e de valência mista indicam que esta última deverá ser a forma relevante para o ciclo catalítico, a forma fisiologicamente activa. Verificou-se que a afinidade do cianeto para o hemo  $b_3$  é 1000 vezes maior na forma de valência mista da NOR, do que na totalmente oxidada ou na totalmente reduzida [66].

#### **4.1.2. qNOR**

A NOR purificada da bactéria desnitrificante *Ralstonia (R.) eutropha* é constituída por apenas uma subunidade de 75 kDa. Esta é homóloga à subunidade B da cNOR com excepção para o facto de possuir uma extensão do N-terminal, de cerca de 280 resíduos, que se pensa formar duas hélices- $\alpha$  adicionais, ligadas por um possível domínio periplásmico. No genoma da bactéria não foi encontrado nenhum gene que codifique para uma subunidade semelhante a NORC. No entanto, foi verificado algum grau de homologia entre a extensão N-terminal da qNOR e a subunidade NORC da cNOR. Esta sugere que a relação evolutiva entre as duas classes de enzimas não se restringe à subunidade NORB.

Análises bioquímicas e espectroscópicas permitiram verificar que a semelhança da subunidade B da cNOR, a qNOR possui dois hemos  $b$  e um ferro não hémico por subunidade. Um dos hemos apresenta uma configuração de spin alto enquanto que o outro se encontra em spin baixo. Não existem hemos do tipo  $c$  nesta enzima. O centro catalítico parece ser conservado em relação à cNOR, pelo que a catálise também deverá ocorrer de forma semelhante nas duas classes de enzimas.

O espectro de UV/visível da qNOR no estado oxidado apresenta um máximo a 414 nm que é deslocado para 423 nm quando a proteína é reduzida com ditionito de sódio. A forma



reduzida apresenta bandas  $\alpha$  e  $\beta$  a 527 nm e 557 nm, respectivamente, indicativas da presença de hemo *b* em configuração de spin baixo.

No espectro de RPE da forma oxidada da NOR de *R. eutropha* observa-se um sinal pouco intenso, típico de ferro hémico em configuração de spin alto, com  $g=6.0$ . Um conjunto de sinais com valores de  $g=2.96$ ,  $g=2.28$  e  $g=1.4$  foram atribuídos ao hemo *b* em configuração de spin baixo. Neste espectro, são ainda visíveis dois sinais com valores de  $g=2.55$  e  $g=2.07$ , cuja origem é desconhecida. Tal como acontece na cNOR, o centro catalítico binuclear não é visível por espectroscopia de RPE.

A enzima é inactiva com citocromos *c* como doadores electrónicos, mas na presença de 2-metil-1,4-naftoquinol, o NO é reduzido à taxa de  $2.3 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$  [67, 68].

Na membrana celular da bactéria, este tipo de NOR deverá ser uma oxidase do quinol. O local de aproximação do quinol à qNOR deverá situar-se na extensão N-terminal existente nesta classe de enzimas.

Enzimas com as mesmas características foram identificadas em microrganismos patogénicos não desnitrificantes como *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitides*, *Corynebacterium diphtheriae* e *Staphylococcus aureus*. À excepção da isolada da bactéria desnitrificante *R. eutropha*, as restantes qNOR são expressas na ausência das restantes enzimas da desnitrificação. Assim sendo, o seu papel fisiológico nestes organismos deverá estar relacionada com a destoxificação do NO existente no ambiente, o qual não foi gerado pela própria bactéria [69, 70].

#### 4.1.3. qCuNOR

A desnitrificação que ocorre nas bactérias Gram positivas é um processo do qual ainda pouco se sabe. Recentemente, foi isolada uma redutase do óxido nítrico a partir da bactéria Gram positiva desnitrificante *Bacillus (B.) azotoformans*, que parece ser um híbrido entre as restantes NOR's e as oxidases terminais contendo cobre. Esta enzima, denominada qCuNOR, é constituída por duas subunidades de 16 kDa e 57 kDa, respectivamente. Estudos bioquímicos e espectroscópicos revelaram a presença de um ferro não hémico, dois hemo do tipo *b* e dois átomos de cobre. Tal como na qNOR, não existem hemo do tipo *c*.

A espectroscopia de RPE permitiu verificar a existência de um hemo em configuração de spin baixo, ao qual correspondem sinais com  $g_z=3.16$ ,  $g_y=2.2$ ,  $g_x=1.27$ , no espectro da

forma oxidada. Neste mesmo espectro é também visível um sinal pouco intenso, a  $g=6$ , típico de hemo em configuração de spin alto.

À semelhança das restantes NOR's, a qCuNOR possui um centro catalítico binuclear, constituído por um hemo  $b$  em configuração de spin alto, e um ferro não hémico. Este centro não é visível por espectroscopia de RPE. O outro hemo  $b$  encontra-se em configuração de spin baixo.

A grande diferença entre esta NOR e as anteriormente descritas é a presença de um centro binuclear de cobre,  $Cu_A$ , apenas existente na subunidade II das oxidases hemo-cobre terminais e na redutase do óxido nitroso e que se pressupõem estar situado na subunidade menor da qCuNOR.

À semelhança da qNOR, a qCuNOR é uma oxidase do quinol. No entanto, ao contrário da primeira, a NOR de *B. azotoformans* não possui a extensão N-terminal que se pensa possuir o local de ligação do quinol. Assim sendo, os electrões tanto poderão ser transferidos através do  $Cu_A$  da subunidade menor, como existir um local de ligação ao quinol na subunidade maior [37, 71].

Na tabela II.1.3. apresenta-se um resumo das principais características de cada uma das classes de NOR's.

**Tabela II.1.3.** Principais características dos diferentes tipos de NOR.

Classe	Doador fisiológico	Número de Subunidades	Peso Molecular das subunidades (kDa)	Co-factores	Centro catalítico
cNOR	Citocromo $c$	2	17, 53	1 hemo $c$ , 2 hemo $b$ , 1 Fe não hémico	$Fe_B$ -hemo $b_3$
qNOR	Quinol	1	75	2 hemo $b$ , 1 Fe não hémico	$Fe_B$ -hemo $b_3$
qCuNOR	Quinol	2	16, 57	1 centro $Cu_A$ , 2 hemo $b$ , 1 Fe não hémico	$Fe_B$ -hemo $b_3$

## 4.2. Relação Entre as Oxidases Terminais Hemo-Cobre e as Redutases do Óxido Nítrico

Análises bioquímicas e genéticas revelaram que a NOR e a oxidase do citocromo *c* evoluíram a partir de um ancestral comum, que se pensa ter sido uma enzima redutora do NO. Foi proposto que a evolução das HCO tenha sido feita a partir da NOR e da N<sub>2</sub>OR em conjunto. A apoiar esta teoria está o facto da N<sub>2</sub>OR possuir um domínio C-terminal tipo cupredoxina, muito semelhante à subunidade II de algumas classes de HCO, e da estrutura prevista para a subunidade *b* da NOR ser semelhante à da subunidade I das HCO. Há ainda o facto de ter sido detectada actividade de redução de NO em algumas oxidases terminais (oxidases *ba*<sub>3</sub> de *Thermus thermophilus* [72], *cbb*<sub>3</sub> de *Ps. stutzeri* [73] e *bo*<sub>3</sub> de *E. coli* [74]) e de se ter verificado redução de O<sub>2</sub> na NOR de *Pa. denitrificans* [52].

A oxidase terminal que mais se assemelha ao protótipo da NOR (cNOR) é o citocromo *cbb*<sub>3</sub>. Esta é a mais divergente das HCO, pensando-se que estará mais próxima da presumível oxidase do citocromo primordial a partir da qual todas terão evoluído. Tem-se especulado que no ambiente da Terra há milhares de anos atrás, é provável que existisse oxigénio em baixas concentrações mesmo antes do aparecimento da fotossíntese. Assim, as primeiras oxidases evoluídas a partir da NOR teriam provavelmente uma maior afinidade para o oxigénio, como é o caso das oxidases do tipo citocromo *cbb*<sub>3</sub>. É possível que a enzima ancestral a partir da qual as HCO evoluíram tivesse incorporado ferro no centro binuclear e não cobre. No ambiente fortemente redutor da biosfera primordial, os iões ferro deveriam encontrar-se mais facilmente disponíveis do que os iões cobre, bastante mais insolúveis. Tendo em conta que a desnitrificação é um processo anterior à respiração aeróbia, a função desta enzima ancestral seria a redução do NO [23].

A diversidade existente entre as oxidases terminais hemo-cobre também está presente nas redutases do óxido nítrico. Em ambos os tipos de enzimas existem classes que oxidam quinol e outras que oxidam citocromos *c*. Nos dois tipos de enzimas, centros de Cu<sub>A</sub> e citocromos *c* funcionam como receptores de electrões em relação ao doador externo.

### 4.2.1. Estrutura Prevista para a Redutase do Óxido Nítrico

Como já foi referido, o modelo estrutural proposto prevê que a NORB possua 12 hélices- $\alpha$  transmembranares, arrançadas em três semi-círculos numa forma sequencial, contra

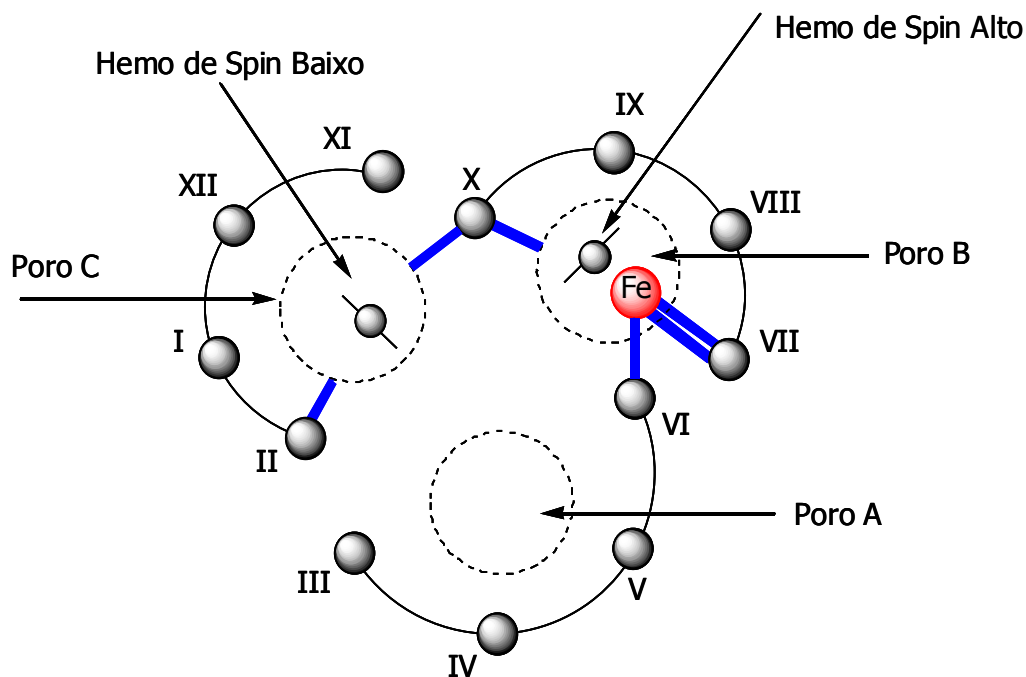
os ponteiros do relógio, começando na hélice 11. O alinhamento das sequências da subunidade B da cNOR de *Ps. stutzeri* e das oxidases terminais hemo-cobre permitiu verificar que as sete histidinas conservadas nas hélices transmembranares II, VI, VII e X das oxidases terminais se mantêm na NOR. Estas foram identificadas como os ligandos dos dois hemos e do cobre nas oxidases terminais.

A diferença fundamental entre a NOR e os restantes membros da superfamília das HCO é a composição do centro binuclear, o qual contém ferro em vez de cobre como nas oxidases terminais. Tendo em conta a semelhança na estrutura entre as oxidases e a NOR, as histidinas conservadas na sequência da NORB deverão funcionar como ligandos dos hemos e do ferro não hémico. O Fe (III) tem como geometria preferencial de coordenação a octaédrica, e penta ou hexa-dentada, ao contrário do Cu (II) cuja geometria preferencial é a tetraédrica distorcida e tetradentada. A análise comparativa das sequências conhecidas da NORB revelou quatro resíduos de ácido glutâmico conservados que não existem nas oxidases terminais. Assim, um ou mais destes glutamatos poderão pertencer à esfera de coordenação do ferro não hémico, em conjunto com as três histidinas conservadas que nas oxidases terminais coordenam o Cu<sub>B</sub>.

No modelo estrutural da NORB de *Ps. stutzeri* (esquemáticamente representado na figura II.1.11), um arco formado pelas hélices 11, 12, 1 e 2, envolve o hemo *b* em configuração de spin baixo, que se propôs ter como ligandos axiais as histidinas 60 e 349 das hélices 2 e 10, respectivamente. Outro arco, formado pelas hélices 7, 8, 9 e 10 envolve o centro binuclear. O hemo *b*<sub>3</sub> deverá coordenar axialmente a histidina 347 da hélice 10, enquanto que o Fe<sub>B</sub> terá como ligandos as histidinas 207 da hélice 6 e 258 e 259 da hélice 7.

A figura II.1.11 é uma representação esquemática da subunidade B na NOR, em que estão assinaladas por uma ligação a azul, as histidinas que se prevê funcionarem como ligandos dos co-factores da proteína.

Pensa-se que o centro activo da NOR se encontra virado para o periplasma. Ao contrário das oxidases terminais, os prótons consumidos durante a redução do NO são obtidos a partir da face exterior da membrana e não existe bombeamento de prótons para geração de uma força propomotriz. [44]. A maioria dos resíduos que se supõe fazer parte da via através da qual os prótons são bombeados nas HCO, não é conservada na NOR.



**Figura II.1.11.** Esquema do modelo proposto para a estrutura da NORB por analogia com a subunidade I das HCO. Os números romanos indicam as hélices transmembranares. As histidinas que coordenam cada um dos co-factores encontram-se assinaladas por uma ligação a azul. Adaptado a partir de Wasser *et al.* [37].

## 5. Bibliografia

1. **Franco, R. e Pereira, A. S.** (1995) "O óxido nítrico, uma molécula versátil." *Química* **58**, 30-34
2. **Feldman, P. L., Griffith, O. W. e Stuehr, D. J.** (1993) "The surprising life of nitric oxide." *Chemical & Engineering News* **71**, 26-38
3. **McCleverty, J. A.** (2004) "Chemistry of nitric oxide relevant to biology." *Chem Rev* **104**, 403-418
4. "<http://www.nobel.se/medicine/laureates/1998/illpres/application.html>."
5. **Khan, S. A. e Hare, J. M.** (2003) "The role os nitric oxide in the physiological regulation of Ca<sup>2+</sup> cycling." *Curr Opin Drug Discov Devel* **6**, 658-666
6. **Wang, T., El Kebir, D. e Blaise, G.** (2003) "Inhaled nitric oxide in 2003: a review of its mechanisms of action." *Can J Anaesth* **50**, 839-846
7. **Xu, W. e Liu, L.** (1998) "Nitric oxide: from a mysterious labile factor to the molecule of the Nobel Prize. Recent progress in nitric oxide research." *Cell Research* **8**, 251-258
8. **Zeidler, P. C. e Castranova, V.** (2004) "Role of nitric oxide in pathological responses of the lung to exposure to environmental/occupational agents." *Redox Rep* **9**, 7-18
9. **Ischiropoulos, H. e Beckman, J. S.** (2003) "Oxidative stress and nitration in neurodegeneration: Cause, effect or association?" *J Clin Invest* **111**, 163-169
10. **Szabó, C.** (2003) "Multiple pathways of peroxynitrite cytotoxicity." *Toxicology Letters* **140-141**, 105-112
11. **Zumft, W. G.** (1997) "Cell biology and molecular basis of denitrification." *Microbiol Mol Biol Rev* **61**, 533-616
12. **Forfia, P. R., Hintze, T. H., Wolin, M. S. e Kaley, G.** (1999) "Role of nitric oxide in the control of mitochondrial function." *Adv Exp Med Biol* **471**, 381-388
13. **Guzik, T. J., Korbust, R. e Adamek-Guzik, T.** (2003) "Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation." *J Physiol Pharmacol* **54**, 469-487
14. **Xu, W., Liu, L. Z., Loizidou, M., Ahmed, M. e Charles, I. G.** (2002) "The role of nitric oxide in cancer." *Cell Research* **12**, 311-320

15. **Victor, V. M., Rocha, M. e De la Fuente, M.** (2004) "Immune cells: free radicals and antioxidants in sepsis." *Int Immunopharm* **4**, 327-347
16. **Maul, H., Longo, M., Saade, G. R. e Garfield, R. E.** (2003) "Nitric oxide and its role during pregnancy: from ovulation to delivery." *Curr Pharm Des* **9**, 359-380
17. **Averill, B. A. e Tiedje, J. M.** (1982) "The chemical mechanism of microbial denitrification." *FEBS Lett* **138**, 8-12
18. **Averill, B. A.** (1996) "Dissimilatory nitrite and nitric oxide reductases." *Chem Rev* **96**, 2951-2964
19. **Ye, R. W., Averill, B. A. e Tiedje, J. M.** (1994) "Denitrification: production and consumption of nitric oxide." *Appl Environ Microbiol* **60**, 1053-1058
20. **Richardson, D. J. e Watmough, N. J.** (1999) "Inorganic nitrogen metabolism in bacteria." *Curr Opin Chem Biol* **3**, 207-219
21. **Berks, B. C., Ferguson, S. J., Moir, J. W. e Richardson, D. J.** (1995) "Enzymes and associated electron transport systems that catalyse the respiratory reduction of nitrogen oxides and oxyanions." *Biochim Biophys Acta* **1232**, 97-173
22. **Watmough, N. J., Butland, G., Cheesman, M. R., Moir, J. W., Richardson, D. J. e Spiro, S.** (1999) "Nitric oxide in bacteria: synthesis and consumption." *Biochim Biophys Acta* **1411**, 456-474
23. **Richardson, D. J.** (2000) "Bacterial respiration: a flexible process for a changing environment." *Microbiology* **146**, 551-571
24. **Hochstein, L. I. e Tomlinson, G. A.** (1988) "The enzymes associated with denitrification." *Annu Rev Microbiol* **42**, 231-261
25. **Goretski, J., Zafiriou, O. C. e Hollocher, T. C.** (1990) "Steady-state nitric oxide concentrations during denitrification." *J Biol Chem* **265**, 11535-11538
26. **Heiss, B., Frunzke, K. e Zumft, W. G.** (1989) "Formation of the N-N bond from nitric oxide by a membrane-bound cytochrome *bc* complex of nitrate-respiring (denitrifying) *Pseudomonas stutzeri*." *J Bacteriol* **171**, 3288-3297
27. **Carr, G. J. e Ferguson, S. J.** (1990) "The nitric oxide reductase of *Paracoccus denitrificans*." *Biochem J* **269**, 423-429

28. **Kim, C. H. e Hollocher, T. C.** (1984) "Catalysis of nitrosyl transfer reaction by a dissimilatory nitrite reductase (cytochrome *cd1*)." *J Biol Chem* **259**, 2092-2099
29. **Ye, R. W., Averill, B. A. e Tiedje, J. M.** (1992) "Characterization of Tn5 mutants deficient in dissimilatory nitrite reduction in *Pseudomonas* sp. strain G-179, which contains a copper nitrite reductase." *J Bacteriol* **174**, 6653-6658
30. **Zumft, W. G., Dohler, K., Korner, H., Lochelt, S., Viebrock, A. e Frunzke, K.** (1988) "Defects in cytochrome *cd1*-dependent nitrite respiration of transposon Tn5-induced mutants from *Pseudomonas stutzeri*." *Arch Microbiol* **149**, 492-498
31. **Goretski, J. e Hollocher, T. C.** (1988) "Trapping of nitric oxide produced during denitrification by extracellular hemoglobin." *J Biol Chem* **263**, 2316-2323
32. **Goretski, J., Zafiriou, O. C. e Hollocher, T. C.** (1990) "Steady-state nitric oxide concentrations during denitrification." *J Biol Chem* **265**, 11535-11538
33. **Braun, C. e Zumft, W. G.** (1991) "Marker exchange of the structural genes for nitric oxide reductase blocks the denitrification pathway of *Pseudomonas stutzeri* at nitric oxide." *J Biol Chem* **266**, 22785-22788
34. **Garber, E. A. e Hollocher, T. C.** (1981) "<sup>15</sup>N tracer studies on the role of NO in denitrification." *J Biol Chem* **256**, 5459-5465
35. **Firestone, M. K., Firestone, R. B. e Tiedje, J. M.** (1979) "Nitric oxide as an intermediate in denitrification: evidence from nitrogen-13 isotope exchange." *Biochem Biophys Res Commun* **91**, 10-16
36. **Moura, I. e Moura, J. J. G.** (2001) "Structural aspects of denitrifying enzymes." *Curr Opin Chem Biol* **5**, 168-175
37. **Wasser, I. M., de Vries, S., Moenne-Loccoz, P., Schroder, I. e Karlin, K. D.** (2002) "Nitric oxide in biological denitrification: Fe/Cu metalloenzyme and metal complex NO(x) redox chemistry." *Chem Rev* **102**, 1201-1234
38. **Hoglen, J. e Hollocher, T. C.** (1989) "Purification and some characteristics of nitric oxide reductase-containing vesicles from *Paracoccus denitrificans*." *J Biol Chem* **264**, 7556-7563
39. **Carr, G. J. e Ferguson, S. J.** (1990) "Nitric oxide formed by nitrite reductase of *Paracoccus denitrificans* is sufficiently stable to inhibit cytochrome oxidase activity and is reduced by its reductase under aerobic conditions." *Biochim Biophys Acta* **1017**, 57-62



40. Prudêncio, M., Pereira, A. S., Tavares, P., Besson, S., Cabrito, I., Brown, K., Samyn, B., Devreese, B., Van Beeumen, J., Rusnak, F., Fauque, G., Moura, J. J. G., Tegoni, M., Cabillau, C. e Moura, I. (2000) "Purification, characterization and preliminary crystallographic study of copper-containing nitrous oxide reductase from *Pseudomonas nautica*." *Biochemistry* **39**, 3899-3907
41. Brown, K., Prudêncio, M., Pereira, A. S., Besson, S., Moura, J. J. G., Moura, I., Tegoni, M. e Cabillau, C. (2000) "A novel type of catalytical copper cluster in nitrous oxide reductase." *Nat Struct Biol* **7**, 191-195
42. Pereira, M. M., Santana, M. e Teixeira, M. (2001) "A novel scenario for the evolution of haem-copper oxygen reductases." *Biochim Biophys Acta* **1505**, 185-208
43. de Gier, J. W., Lubben, M., Reijnders, W. N., Tipker, C. A., Slotboom, D. J., van Spanning, R. J., Stouthamer, A. H. e van der Oost, J. (1994) "The terminal oxidases of *Paracoccus denitrificans*." *Mol Microbiol* **13**, 183-196
44. Garcia-Horsman, J. A., Barquera, B., Rumbley, J., Ma, J. e Gennis, R. B. (1994) "The superfamily of heme-copper respiratory oxidases." *J Bacteriol* **176**, 5587-5600
45. van der Oost, J., de Boer, A. P., de Gier, J. W., Zumft, W. G., Stouthamer, A. H. e van Spanning, R. J. (1994) "The heme-copper oxidase family consists of three distinct types of terminal oxidases and is related to nitric oxide reductase." *FEMS Microbiol Lett* **121**, 1-9
46. de Vries, S. e Schroder, I. (2002) "Comparison between the nitric oxide reductase family and its aerobic relatives, the cytochrome oxidases." *Biochem Soc Trans* **30**, 662-667
47. Kim, E., Chufan, E. E., Kamaraj, K. e Karlin, K. D. (2004) "Synthetic models for heme-copper oxidases." *Chem Rev* **104**, 1077-1133
48. Pereira, M. M., Gomes, C. M. e Teixeira, M. (2002) "Plasticity of proton pathways in haem-copper oxygen reductases." *FEBS Lett* **522**, 14-18
49. Dermastia, M., Turk, T. e Hollocher, T. C. (1991) "Nitric oxide reductase. Purification from *Paracoccus denitrificans* with use of a single column and some characteristics." *J Biol Chem* **266**, 10899-10905
50. Girsch, P. e de Vries, S. (1997) "Purification and initial kinetic and spectroscopic characterization of NO reductase from *Paracoccus denitrificans*." *Biochim Biophys Acta* **1318**, 202-216

51. **Kastrau, D. H., Heiss, B., Kroneck, P. M. e Zumft, W. G.** (1994) "Nitric oxide reductase from *Pseudomonas stutzeri*, a novel cytochrome *bc* complex. Phospholipid requirement, electron paramagnetic resonance and redox properties." *Eur J Biochem* **222**, 293-303
52. **Fujiwara, T. e Fukumori, Y.** (1996) "Cytochrome *cb*-type nitric oxide reductase with cytochrome *c* oxidase activity from *Paracoccus denitrificans* ATCC 35512." *J Bacteriol* **178**, 1866-1871
53. **Sakurai, N. e Sakurai, T.** (1997) "Isolation and characterization of nitric oxide reductase from *Paracoccus halodenitrificans*." *Biochemistry* **36**, 13809-13815
54. **Hendriks, J., Warne, A., Gohlke, U., Haltia, T., Ludovici, C., Lubben, M. e Saraste, M.** (1998) "The active site of the bacterial nitric oxide reductase is a dinuclear iron center." *Biochemistry* **37**, 13102-13109
55. **Moenne-Loccoz, P., Richter, O. M. H., Huang, H., Wasser, I. M., Ghiladi, R. A., Karlin, K. D. e de Vries, S.** (2000) "Nitric oxide reductase from *Paracoccus denitrificans* contains an oxo-bridged heme/non-heme diiron center." *J Am Chem Soc* **122**, 9344-9345
56. **Gronberg, K. L., Roldan, M. D., Prior, L., Butland, G., Cheesman, M. R., Richardson, D. J., Spiro, S., Thomson, A. J. e Watmough, N. J.** (1999) "A low-redox potential heme in the dinuclear center of bacterial nitric oxide reductase: implications for the evolution of energy-conserving heme-copper oxidases." *Biochemistry* **38**, 13780-13786
57. **de Boer, A. P., van der Oost, J., Reijnders, W. N., Westerhoff, H. V., Stouthamer, A. H. e van Spanning, R. J.** (1996) "Mutational analysis of the *nor* gene cluster which encodes nitric-oxide reductase from *Paracoccus denitrificans*." *Eur J Biochem* **242**, 592-600
58. **Oubrie, A., Gemeinhardt, S., Field, S., Marritt, S., Thomson, A. J., Saraste, M. e Richardson, D. J.** (2002) "Properties of a soluble domain of subunit C of a bacterial nitric oxide reductase." *Biochemistry* **41**, 10858-10865
59. **Moenne-Loccoz, P. e de Vries, S.** (1998) "Structural characterization of the catalytic high-spin heme *b* of nitric oxide reductase: a resonance Raman study." *J Am Chem Soc* **120**, 5147-5152
60. **Sakurai, T., Sakurai, N., Matsumoto, H., Hirota, S. e Yamauchi, O.** (1998) "Roles of four iron centers in *Paracoccus halodenitrificans* nitric oxide reductase." *Biochem Biophys Res Commun* **251**, 248-251

61. **Cheesman, M. R., Zumft, W. G. e Thomson, A. J.** (1998) "The MCD and EPR of the heme centers of nitric oxide reductase from *Pseudomonas stutzeri*: evidence that the enzyme is structurally related to the heme-copper oxidases." *Biochemistry* **37**, 3994-4000
62. **Kurose, S., Sakurai, N. e Sakurai, T.** (2001) "Perturbations at the high spin heme *b* center in the membrane-bound nitric oxide reductase." *J Inorg Biochem* **83**, 281-286
63. **Pinakoulaki, E., Gemeinhardt, S., Saraste, M. e Varotsis, C.** (2002) "Nitric-oxide reductase. Structure and properties of the catalytic site from resonance Raman scattering." *J Biol Chem* **277**, 23407-23413
64. **Hendriks, J. H., Prior, L., Baker, A. R., Thomson, A. J., Saraste, M. e Watmough, N. J.** (2001) "Reaction of carbon monoxide with the reduced active site of bacterial nitric oxide reductase." *Biochemistry* **40**, 13361-13369
65. **Field, S. J., Prior, L., Roldan, M. D., Cheesman, M. R., Thomson, A. J., Spiro, S., Butt, J. N., Watmough, N. J. e Richardson, D. J.** (2002) "Spectral properties of bacterial nitric-oxide reductase: resolution of pH-dependent forms of the active site heme *b3*." *J Biol Chem* **277**, 20146-20150
66. **Gronberg, K. L., Watmough, N. J., Thomson, A. J., Richardson, D. J. e Field, S. J.** (2004) "Redox-dependent Open and Closed Forms of the Active Site of the Bacterial Respiratory Nitric-oxide Reductase Revealed by Cyanide Binding Studies." *J Biol Chem* **279**, 17120-17125
67. **Cramm, R., Pohlmann, A. e Friedrich, B.** (1999) "Purification and characterization of the single-component nitric oxide reductase from *Ralstonia eutropha* H16." *FEBS Lett* **460**, 6-10
68. **Cramm, R., Siddiqui, R. A. e Friedrich, B.** (1997) "Two isofunctional nitric oxide reductases in *Alcaligenes eutrophus* H16." *J Bacteriol* **179**, 6769-6777
69. **Hendriks, J., Oubrie, A., Castresana, J., Urbani, A., Gemeinhardt, S. e Saraste, M.** (2000) "Nitric oxide reductases in bacteria." *Biochim Biophys Acta* **1459**, 266-273
70. **Householder, T. C., Fozo, E. M., Cardinale, J. A. e Clark, V. L.** (2000) "Gonococcal nitric oxide reductase is encoded by a single gene, *norB*, which is required for anaerobic growth and is induced by nitric oxide." *Infect Immun* **68**, 5241-5246

71. **Suharti, Strampraad, M. J., Schroder, I. e de Vries, S.** (2001) "A novel copper A containing menaquinol NO reductase from *Bacillus azotoformans*." *Biochemistry* **40**, 2632-2639
72. **Giuffre, A., Stubauer, G., Sarti, P., Brunori, M., Zumft, W. G., Buse, G. e Soulimane, T.** (1999) "The heme-copper oxidases of *Thermus thermophilus* catalyze the reduction of nitric oxide: evolutionary implications." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 14718-14723
73. **Forte, E., Urbani, A., Saraste, M., Sarti, P., Brunori, M. e Giuffre, A.** (2001) "The cytochrome *cbb3* from *Pseudomonas stutzeri* displays nitric oxide reductase activity." *Eur J Biochem* **268**, 6486-6491
74. **Butler, C., Forte, E., Maria Scandurra, F., Arese, M., Giuffre, A., Greenwood, C. e Sarti, P.** (2002) "Cytochrome *bo(3)* from *Escherichia coli*: the binding and turnover of nitric oxide." *Biochem Biophys Res Commun* **296**, 1272-1278

## *CAPÍTULO 2*

---

---

### Purificação da Redutase do Óxido Nítrico

---

---

Capítulo 2 – Purificação da Redutase do Óxido Nítrico de *Pseudomonas nautica*

1. A Bactéria <i>Pseudomonas nautica</i> 617 .....	165
2. Purificação da Redutase do Óxido Nítrico.....	165
2.1. Crescimento da Bactéria <i>Pseudomonas nautica</i> 617 .....	166
2.2. Preparação das Membranas .....	167
2.3. Solubilização e Purificação .....	167
3. Bibliografia .....	175

## 1. A Bactéria *Pseudomonas nautica* 617

*Pseudomonas nautica* 617 ("Institute Pasteur Culture Collection" 617/1.85) foi isolada de sedimentos costeiros marinhos contaminados com os efluentes de uma refinaria de petróleo. É uma bactéria halófila obrigatória, anaeróbia facultativa, capaz de degradar *n*-alcanos em aerobiose. Leva a cabo uma via da desnitrificação completa, reduzindo o nitrato a azoto atmosférico. É uma bactéria Gram negativa com forma de bastonete, cuja mobilidade lhe é conferida pela presença de um flagelo polar único [1-3]. Para além do Na<sup>+</sup> ser um requisito essencial ao seu crescimento, é também sensível ao Mg<sup>2+</sup>, cuja presença é necessária para atingir uma taxa de crescimento máxima [4].

Foi proposta a reclassificação da espécie *Pseudomonas nautica* como *Marinobacter hydrocarbonoclausticus* [5, 6]. No entanto, como a estirpe 617 ainda aguarda classificação, e tendo em conta dados recentes não publicados de sequenciação do ARN 16S desta estirpe, que indicam ser diferente de *Marinobacter hydrocarbonoclausticus*, esta continuará a ser referida como *Pseudomonas nautica* 617 ao longo desta tese.

## 2. Purificação da Redutase do Óxido Nítrico

A purificação de proteínas membranares é bastante mais complexa e sensível do que a das proteínas solúveis. Para extrair a proteína pretendida da estrutura membranar em que esta é estável é necessário recorrer ao uso de detergentes. A escolha do detergente ideal para a purificação de uma proteína pode ser um factor essencial no sucesso alcançado, visto que muitos detergentes inactivam irreversivelmente as enzimas. É essencial seleccionar um detergente eficaz durante a solubilização, mas que não desnature a proteína. Deve-se também verificar qual a força iónica mínima em que a proteína é homogénea e a força iónica máxima que não causa a dissociação de subunidades lábeis.

As proteínas membranares são mais estáveis na estrutura da membrana, na qual a acção das proteases é lenta quando comparada com a rápida degradação muitas vezes observada após a solubilização com detergentes. Assim, quando se pretende purificar proteínas membranares a adição de inibidores de proteases durante a solubilização torna-se muito importante. Durante a purificação, surgem outros problemas. As proteínas membranares têm tendência a formar agregados mesmo na presença de detergentes, o que reduz a eficácia dos processos de separação. A cromatografia de filtração em gel, é geralmente pouco eficaz neste tipo de purificação porque as proteínas membranares de baixa

massa molecular formam agregados com um maior número de moléculas de detergente do que as maiores, mascarando assim, as diferenças na massa molecular. Os detergentes aniônicos não permitem uma eficaz separação por cromatografia de troca iónica ou de hidroxilapatite. A perda de lípidos por parte das proteínas, devido aos detergentes, pode provocar a perda de actividade catalítica ou mesmo a sua integridade estrutural. A escolha do detergente deve ter em conta se a proteína é integralmente membranar ou periférica, devendo-se eleger um detergente mais hidrofóbico no primeiro caso e mais hidrofílico no segundo [7].

O detergente escolhido para levar a cabo a solubilização da NOR de *Ps. nautica* foi o dodecilato de  $\alpha$ -D-maltose (DM), um detergente não iónico, o qual se provou em relação às restantes cNOR's ser um detergente eficaz no passo de solubilização, e também na manutenção a estabilidade da enzima. Para uma maior a estabilidade incluí-se 2-feniletanol (FE) nos tampões de purificação e armazenamento [8, 9]. A NOR é solubilizada por detergentes como Triton X-100 ou Triton X-114, no entanto, perde cerca de 50% da sua actividade. Esta perda de actividade pode ser apenas parcialmente revertida pela adição de lípidos como a cardiolipina ou o fosfatidilglicerol. Detergentes como o DM suprimem a necessidade de fosfolípidos na actividade da NOR [10-12].

A concentração de detergente usada ao longo de todo o processo é determinada com base na concentração micelar crítica (CMC) do detergente. Este parâmetro indica a solubilidade do detergente em água, valor acima do qual ocorre a formação de micelas. A concentração mínima de detergente usada nos tampões deve ser aproximadamente igual ao valor da CMC, pois esta é a concentração mínima de detergente livre necessária para manter as proteínas em solução.

### **2.1. Crescimento da Bactéria *Pseudomonas nautica* 617**

O crescimento da bactéria *Ps. nautica* em condições desnitrificantes foi realizado na “Unité de Fermentation”, CNRS, em Marselha. As condições de crescimento e o processo de obtenção das membranas celulares encontram-se descritos no Apêndice A.



## 2.2. Preparação das Membranas

As membranas obtidas através do procedimento indicado no Apêndice A, são descongeladas, lavadas com tampão 50 mM Tris-HCl pH=8 e ultracentrifugadas a  $180\,000 \times g$ , durante 90 min, a 4°C. Após este passo, são homogeneizadas em tampão 50 mM Tris-HCl, pH=8, 100 mM KCl, à razão de 10 mg/ml, e sonicadas quatro vezes durante 10 min em porções de 500 ml cada, arrefecidas em gelo. As membranas são ultracentrifugadas como anteriormente, e lavadas mais uma vez com excesso de tampão 50 mM Tris-HCl pH=8, após o que se segue uma nova ultracentrifugação. Finalmente, são ressuspensas em 50 mM Tris-HCl pH=8, homogeneizadas e guardadas a -70°C.

## 2.3. Solubilização e Purificação

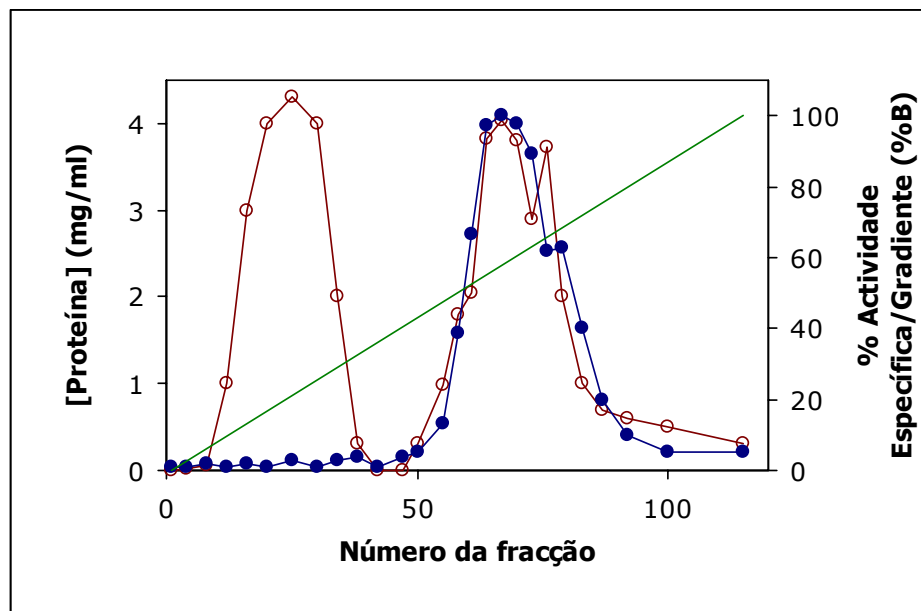
As membranas lavadas pelo procedimento anterior são descongeladas e ressuspensas em tampão 50 mM Tris-HCl pH=8, de forma a obter uma concentração de proteína de 10 mg/ml. Adiciona-se 2-feniletanol para uma concentração final de 0.02% (v/v). À suspensão anterior, arrefecida em gelo e sob agitação, é adicionado o detergente de extracção, dodecilato de  $\alpha$ -D-maltose, para uma concentração final de 0.6% (p/v)<sup>1</sup>. Após 15 minutos de incubação em gelo, a mistura é ultracentrifugada a  $180\,000 \times g$ , durante 90 min, a 4°C.

A purificação decorre a 4°C. O sobrenadante da ultracentrifugação, após adição de inibidores de proteólise (1 mM PMSF e 10 mM benzamidina), é aplicado numa coluna de DEAE-Biogel A (*Bio-Rad*, 5.5×25.5 cm) equilibrada com 50 mM Tris-HCl pH=8, 0.02% DM, 0.01% FE. Após aplicação, lava-se a coluna, com 1.5 volumes do mesmo tampão com o intuito de eluir todas as proteínas não adsorvidas. Para a eluição das proteínas adsorvidas à resina, aplica-se um gradiente linear de força iónica crescente entre 0 e 500 mM de NaCl em tampão 50 mM Tris-HCl, 0.02% DM, 0.01% FE, com um volume total de 1,6 litros. A presença de NOR é verificada através de ensaios de actividade e espectros de UV/visível. Os ensaios têm que ser normalizados na quantidade de proteína total adicionada<sup>2</sup>, pelo que se torna necessário fazer determinações de proteína através do método de BCA (ver Apêndice B).

<sup>1</sup> A partir de uma solução “stock” com uma concentração de 10% (p/v)

<sup>2</sup> Devido à dependência da actividade em função da concentração de enzima no ensaio, a qual será abordada mais à frente neste Capítulo.

Na figura II.2.1. podemos observar o perfil de eluição da coluna DEAE-Biogel A com as concentrações de proteína e actividade de cada fracção.



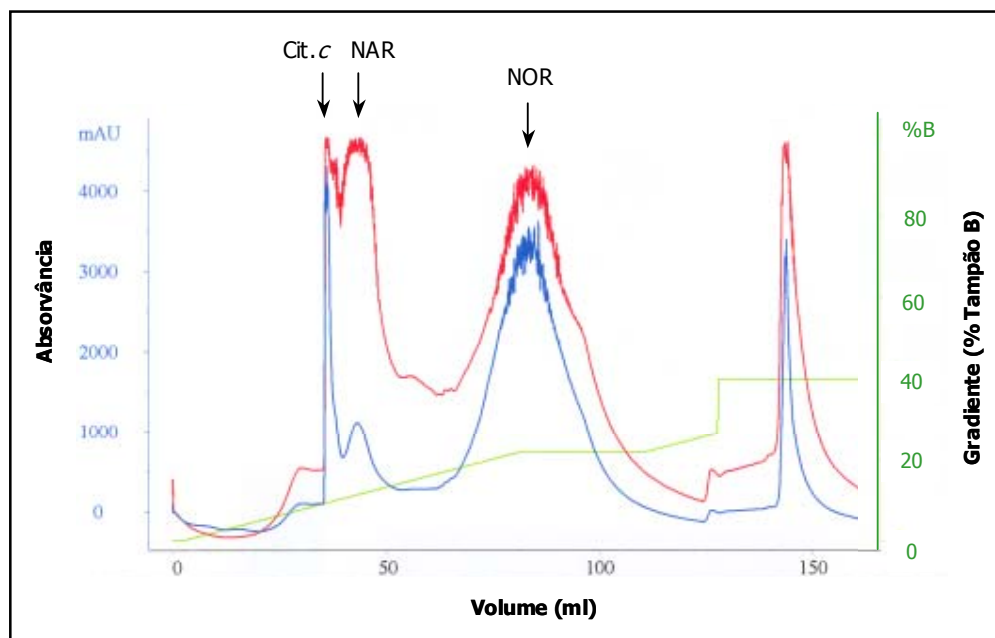
**Figura II.2.1.** Perfil de eluição da coluna DEAE-Biogel A, eluída com um gradiente de 0 a 500 mM de NaCl. (○) representa a concentração de proteína em mg/ml, (●) a % de actividade específica em relação ao valor máximo atingido e (—) o gradiente em % do Tampão B (50 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 0.02% DM, 0.01% FE).

As fracções com uma percentagem de actividade específica superior a 40%, eluídas entre cerca de 290 e 350 mM de NaCl, foram recolhidas numa única fracção, à qual se aumentou a percentagem de DM para 0.1%. Os passos seguintes são efectuados em cromatografia líquida de alta pressão (HPLC).

A fracção da NOR eluída da coluna DEAE-Biogel A, é por sua vez aplicada numa coluna pré-empacotada “*Ceramic hidroxilapatite*” (CHT-I) (*Bio-Rad*, 20 ml), equilibrada com tampão 50 mM Tris-HCl pH=8, 300 mM NaCl, 0.02% DM, 0.01% FE. Para eluição aplica-se um gradiente entre o tampão A, 50 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, 0.02% DM, 0.01% FE, e o tampão B, 1.5 M KPi pH=7, 0.02% DM, 0.01% FE. O perfil de eluição desta coluna encontra-se na figura II.2.2.

As enzimas membranares apresentam uma tendência para o arrastamento das bandas nas colunas hidroxilapatite. No entanto, o aumento da concentração de DM na amostra

aplicada na CHT-I para 0.1% diminui consideravelmente esta tendência. Também o uso de uma coluna de hidroxilapatite de elevada resolução como a CHT diminui bastante o arrastamento das bandas e permite obter uma boa separação neste passo.

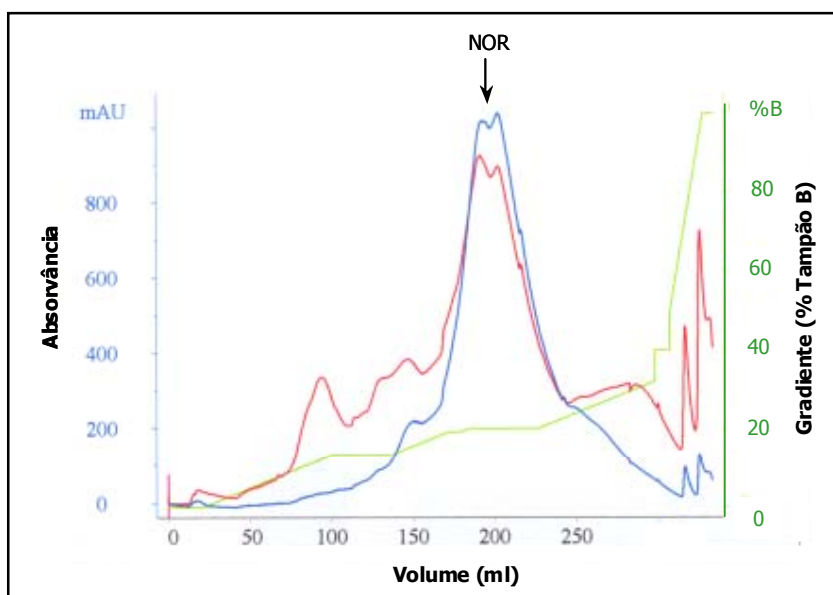


**Figura II.2.2.** Perfil de eluição da primeira injeção na coluna CHT-I com um gradiente crescente em tampão fosfato entre 0 e 1.5 M. Mediram-se as absorvâncias a 280 (—) e 410 nm (—). O gradiente linear crescente de tampão fosfato é apresentado em percentagem do tampão B (—). A banda correspondente à NOR encontra-se assinalada.

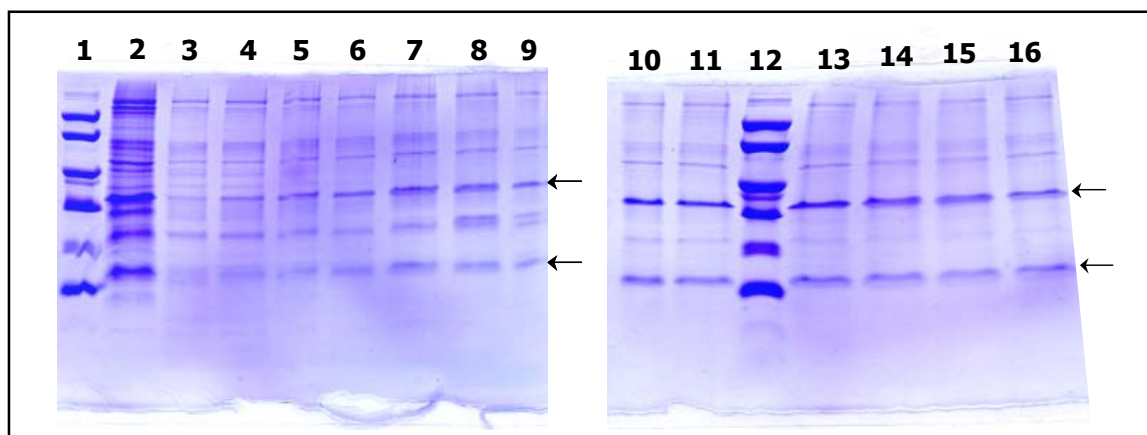
A NOR é eluída a aproximadamente 300 mM de KPi (20% de tampão B). A fracção de NOR mais pura é reunida com base na razão entre as absorvâncias a 410 nm e 280 nm. Juntam-se as fracções com uma razão  $A_{410}/A_{280}$  acima de 1. A esta fracção, diluída 1:3, aumenta-se novamente a percentagem de DM para 0.1% e procede-se a uma nova aplicação na coluna CHT-I, equilibrada com 100 mM KPi pH=7, 0.02% DM, 0.01% FE. A eluição é feita por aplicação de um gradiente linear desde 100 a 1500 mM KPi pH=7, 0.02% DM, 0.01% FE. O perfil de eluição desta coluna encontra-se na figura II.2.3.

A fracção de NOR pura, eluída aproximadamente a 300 mM KPi, com uma razão de pureza  $A_{411\text{nm}}/A_{280\text{nm}} \approx 1.3$ , é reunida com base em géis de SDS-PAGE de todas as fracções eluídas da coluna. A fracção é concentrada num Diaflo (*Amicon*), equipado com uma membrana YM 30, e o tampão trocado para 100 mM KPi pH=7, 0.05% DM, 0.01% FE para

armazenamento a  $-70^{\circ}\text{C}$ . Na figura II.2.4 podem ser observados dois géis de SDS-PAGE das fracções da segunda injeção na coluna CHT-I.

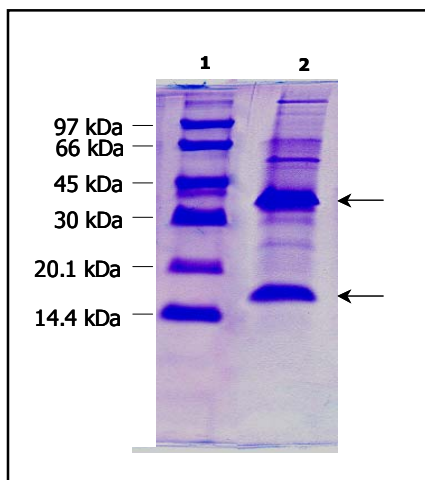


**Figura II.2.3.** Perfil de eluição da segunda injeção na coluna CHT-I com um gradiente crescente entre 100 e 1500 mM de KPi. Mediram-se as absorbâncias a 280 (—) e 410 nm (—). O gradiente linear crescente de fosfato é apresentado em percentagem do tampão B (—). A banda correspondente à NOR encontra-se assinalada.



**Figura II.2.4.** Géis de Tricina SDS-PAGE (10% T, 3% C) das várias fracções ao longo da segunda injeção na coluna CHT-I. **Poços: 1 e 12.** Padrão de pesos moleculares (*Amersham Biosciences*): 97 kDa, 66 kDa, 45 kDa, 30 kDa, 20.1 kDa, 14.4 kDa, **2 -11, e 13-16**, fracções eluídas da coluna CHT-I. As bandas correspondentes às duas subunidades da NOR encontram-se assinaladas por setas.

A figura II.2.5. apresenta um gel de Tricina SDS-PAGE da fracção pura da NOR de *Ps. nautica*.

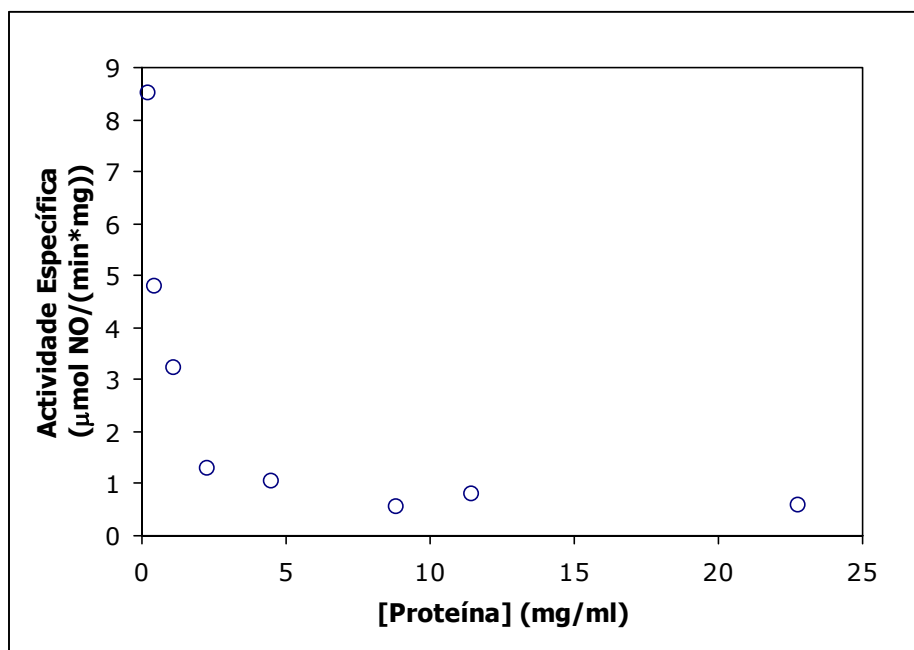


**Figura II.2.5.** Gel de Tricina SDS-PAGE (10% T, 3% C) da fracção pura da NOR de *Ps. nautica*. **Poços:** 1. Padrão de pesos moleculares (Amersham Biosciences), 2. NOR de *Ps. nautica*. As bandas correspondentes às duas subunidades da NOR encontram-se assinaladas por setas.

Duas bandas principais podem ser observadas no gel: uma com cerca de 17 kDa correspondente à subunidade NORC e a outra com uma massa molecular aparente de cerca de 36 kDa correspondente à NORB. No gel é ainda possível observar duas outras bandas menos intensas com peso aproximado de 57 kDa e 66 kDa. Estas deverão corresponder aos agregados da NORB também observados nas fracções puras da NOR isolada de *Pa. denitrificans* e *Ps. stutzeri* e cuja intensidade aumenta se as amostras foram fervidas ao invés de aquecidas a 40°C (ver preparação das amostras para o gel no Apêndice B).

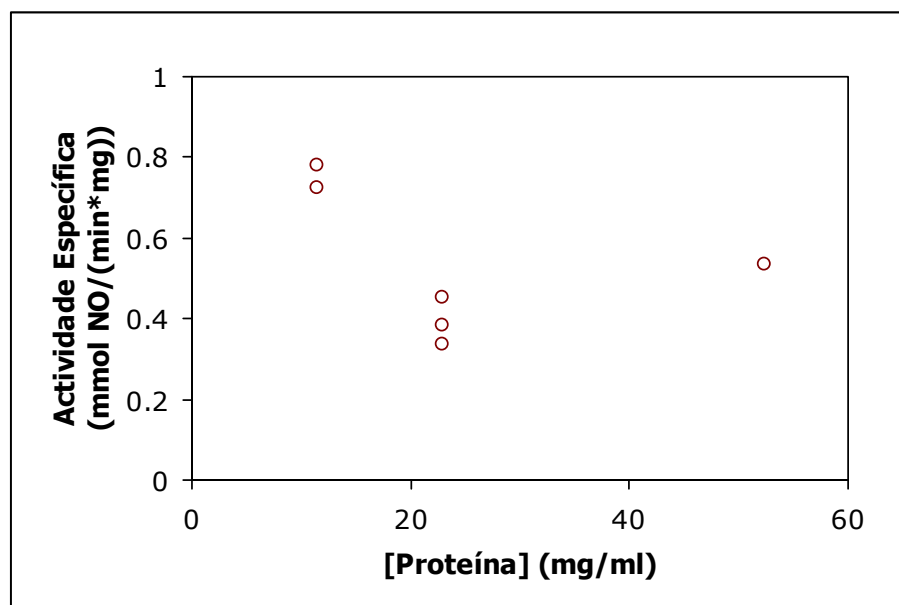
O facto de não se usar o perfil de actividade para reunir a fracção mais pura eluída da coluna CHT-I, é resultado do elevado grau de erro do ensaio de actividade, o qual faz com que fracções muito diluídas apresentem elevada actividade específica.

Os erros inerentes ao ensaio de actividade da redutase do NO encontram-se ilustrados nas figuras II.2.6 e II.2.7. Para a realização dos ensaios ilustrados nestas duas figuras usou-se NOR proveniente do mesmo “stock”, mas de diferentes diluições no caso da figura II.2.6 e da mesma diluição mas com adição de volumes diferentes à mistura reaccional no caso da figura II.2.7. A actividade específica é apresentada em  $\mu\text{mol}$  de NO reduzidas por minuto e por miligrama de proteína total (determinada através do método de BCA).



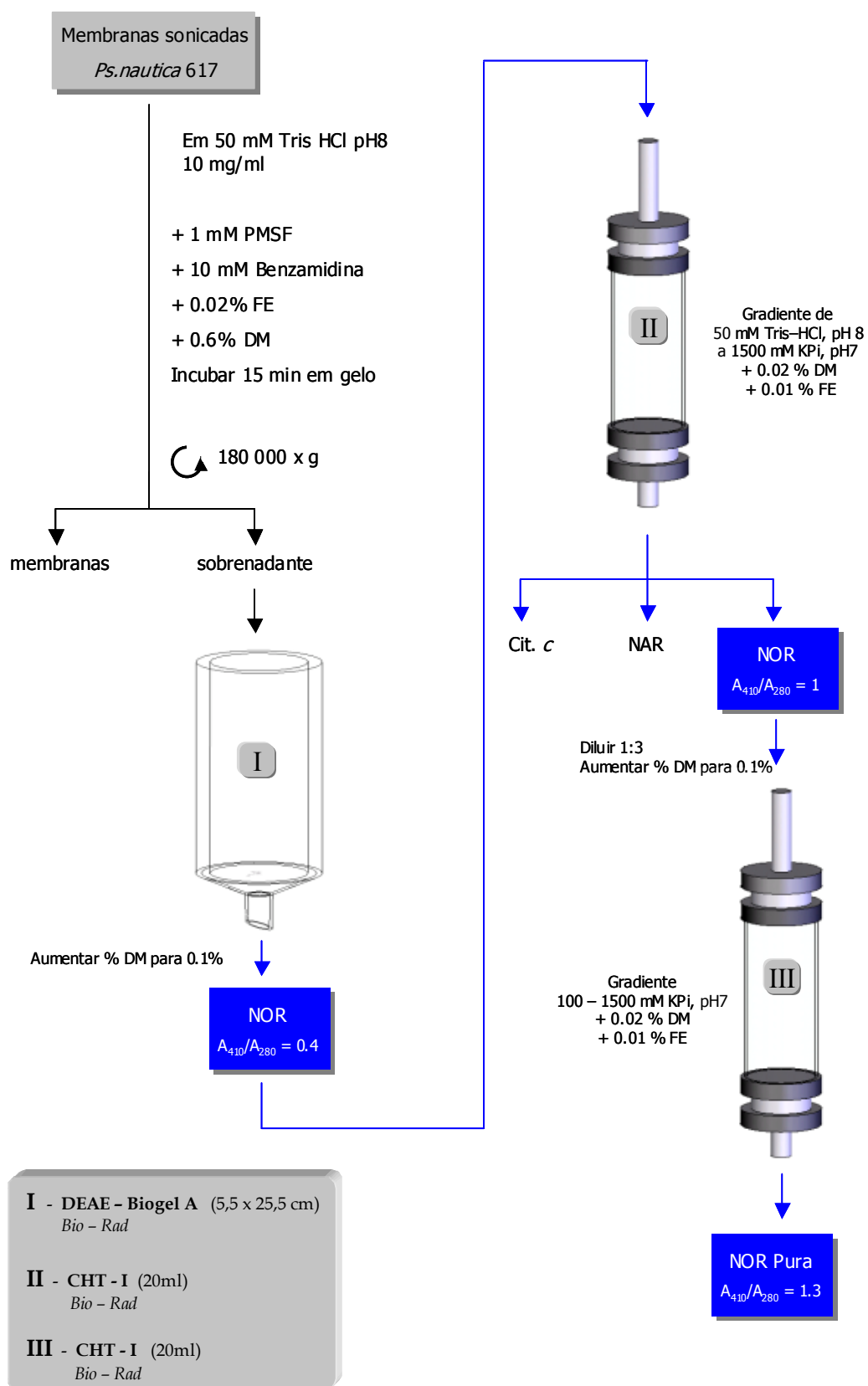
**Figura II.2.6.** Gráfico da actividade específica da NOR em função da concentração de proteína na mistura reaccional. Para a realização destes ensaios fizeram-se diferentes diluições a partir do mesmo “stock” de enzima.

Através da observação destas duas figuras verifica-se que a actividade específica é mais elevada com menores concentrações de proteína no ensaio. Este facto é responsável pela obtenção de actividades anormalmente elevadas quando se testam os tubos mais diluídos ao longo da purificação.



**Figura II.2.7.** Gráfico da actividade específica da NOR em função da concentração de proteína na mistura reaccional. Foram adicionados diferentes volumes de enzima provenientes do mesmo “stock”.

Na figura II.2.8 é apresentado um esquema da purificação da NOR de *Ps. nautica* 617 a partir das membranas sonicadas.



**Figura II.2.8.** Esquema da purificação da NOR de *Pseudomonas nautica* 617.



### 3. Bibliografia

1. **Bonin, P., Barbotin, J. N., Dhulster, P. e Bertrand, J. C.** (1987) "Nitrate reduction in stimulated microniches by a denitrifying marine bacterium." *Can. J. Microbiol* **33**, 276-279
2. **Bonin, P., Gilewicz, M. e Bertrand, J. C.** (1987) "Denitrification by a marine bacterium *Pseudomonas nautica* strain 617." *Ann Inst Pasteur Microbiol* **138**, 371-383
3. **Besson, S., Carneiro, C., Moura, J. J. G., Moura, I. e Fauque, G.** (1995) "A cytochrome *cd1*-type nitrite reductase isolated from the marine denitrifier *Pseudomonas nautica* 617: purification and characterization." *Anaerobe* **1**, 219-226
4. **Bonin, P., Gilewicz, M., Denis, M. e Bertrand, J. C.** (1989) "Salt requirements in the denitrifying bacterium *Pseudomonas nautica* 617." *Res Microbiol* **140**, 159-169
5. **Gauthier, M. J., Lafay, B., Christen, R., Fernandez, L., Acquaviva, M., Bonin, P. e Bertrand, J. C.** (1992) "*Marinobacter hydrocarbonoclasticus* gen. nov., sp. nov., a new, extremely halotolerant, hydrocarbon-degrading marine bacterium." *Int J Syst Bacteriol* **42**, 568-576
6. **Sproer, C., Lang, E., Hobeck, P., Burghardt, J., Stackebrandt, E. e Tindall, B. J.** (1998) "Transfer of *Pseudomonas nautica* to *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*." *International Journal of Systematic Bacteriology* **48**, 1445-1448
7. **von Jagow, G. e Schagger, H.** (1994) "*A Practical Guide to Membrane Protein Purification*", Academic Press
8. **Carr, G. J. e Ferguson, S. J.** (1990) "The nitric oxide reductase of *Paracoccus denitrificans*." *Biochem J* **269**, 423-429
9. **Sakurai, N. e Sakurai, T.** (1997) "Isolation and characterization of nitric oxide reductase from *Paracoccus halodenitrificans*." *Biochemistry* **36**, 13809-13815
10. **Kastrau, D. H., Heiss, B., Kroneck, P. M. e Zumft, W. G.** (1994) "Nitric oxide reductase from *Pseudomonas stutzeri*, a novel cytochrome *bc* complex. Phospholipid requirement, electron paramagnetic resonance and redox properties." *Eur J Biochem* **222**, 293-303
11. **Heiss, B., Frunzke, K. e Zumft, W. G.** (1989) "Formation of the N-N bond from nitric oxide by a membrane-bound cytochrome *bc* complex of nitrate-respiring (denitrifying) *Pseudomonas stutzeri*." *J Bacteriol* **171**, 3288-3297

12. **Shapleigh, J. P., Davies, K. J. e Payne, W. J.** (1987) "Detergent inhibition of nitric-oxide reductase activity." *Biochim Biophys Acta* **911**, 334-340

## *CAPÍTULO 3*

---

---

# Caracterização Bioquímica e Espectroscópica

---

---

Capítulo 3 – Caracterização Bioquímica e Espectroscópica

1. Introdução .....	179
2. Caracterização Bioquímica .....	179
2.1. Determinação do Coeficiente de Extinção Molar.....	179
2.2. Determinação do Conteúdo em Ferro Hémico .....	179
2.3. Determinação do Conteúdo em Ferro Não Hémico .....	180
2.4. Determinação da Massa Molecular .....	181
3. Caracterização Espectroscópica.....	181
3.1. Espectroscopia de UV/visível .....	181
3.2. Espectroscopia de RPE.....	182
4. Bibliografia .....	192

## 1. Introdução

A NOR isolada da bactéria *Ps. nautica* 617 é constituída por duas subunidades: NORB e NORC. Os seus pesos moleculares aparentes determinados por electroforese em gel de poliacrilamida desnaturante são cerca de 36 kDa e 17 kDa, respectivamente. Esta enzima, de acordo com o número de subunidades determinado e com a estequiometria de co-factores, pertence à classe das cNOR's. A sequência dos genes *norB* e *norC* será apresentada no próximo capítulo, calculando-se a partir da respectiva sequência de aminoácidos, a massa molecular de cada subunidade.

Neste capítulo descrever-se-á a caracterização a nível bioquímico e espectroscópico da cNOR de *Ps. nautica*.

## 2. Caracterização Bioquímica

### 2.1. Determinação do Coeficiente de Extinção Molar

As determinações do conteúdo em proteína total foram realizadas através do método BCA (ver Apêndice B). No entanto, devido à interferência do detergente no método, as determinações não são muito reprodutíveis. Assim, tendo em conta que a NOR de *Ps. nautica* pertence à classe das cNOR, é de esperar um valor de 4 ferros por proteína. Isso permitiu a determinação de um coeficiente de extinção molar aproximado, baseado no espectro de amostras cuja determinação do conteúdo total em ferro foi realizada por espectroscopia de emissão atómica por plasma induzido (ICP).

O valor determinado para o coeficiente de extinção molar (da NOR oxidada) ao comprimento de onda da banda do Soret, 411 nm, foi de  $325\,000\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ . Este foi usado para a determinação do número de ferros hémicos e não hémicos por proteína, bem como para todas as determinações da concentração da NOR ao longo deste trabalho.

A técnica de ICP permitiu ainda verificar a não existência de cobre ou quaisquer outros metais para além do ferro na NOR de *Ps. nautica*.

### 2.2. Determinação do Conteúdo em Ferro Hémico

A determinação do conteúdo em ferro hémico foi efectuada através do método piridina-hemocromogénio, com recurso a um sistema de equações desenvolvido por Berry e

Trumpower [1] (ver Apêndice B). Os valores obtidos para as diferentes amostras de NOR pura encontram-se na tabela II.3.1. Os resultados permitem-nos concluir a existência de 2 hemos do tipo *b* e 1 hemo do tipo *c* por proteína.

**Tabela II.3.1.** Resultados da determinação do conteúdo em hemos *b* e *c* pelo método de Piridina-Hemocromogéneo.

Amostra	Hemos <i>b</i> /proteína	Hemos <i>c</i> /proteína
I	1.70	1.08
II	1.95	1.10
III	1.97	1.10
IV	2.01	1.10

### 2.3. Determinação do Conteúdo em Ferro Não Hémico

O conteúdo em ferro não hémico foi determinado através do método de TPTZ (ver Apêndice B). Os resultados desta análise são apresentados na tabela II.3.2, para as mesmas amostras cuja determinação do conteúdo em hemos se encontra na tabela II.3.1.

**Tabela II.3.2.** Resultados da determinação do conteúdo em ferro não hémico pelo método de TPTZ.

Amostra	Ferro não hémico /proteína
I	0.93
II	0.96
III	1.00
IV	1.04

Através da observação da tabela II.3.2 pode-se concluir a existência de 1 ferro não hémico por proteína. Assim sendo, a NOR de *Ps. nautica*, à semelhança das restantes cNOR's apresenta uma estequiometria de 2 hemos *b*: 1 hemo *c*: 1 ferro não hémico.

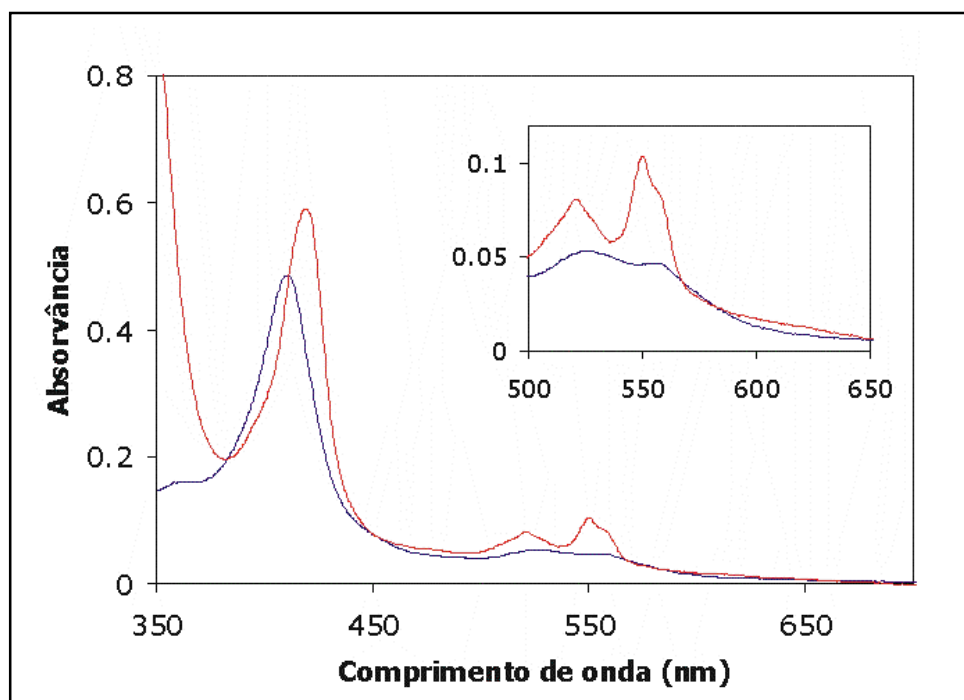
## 2.4. Determinação da Massa Molecular

Da análise da NOR de *Ps. nautica* por espectrometria de massa, apenas se conseguiu obter o peso molecular da subunidade NORC. O seu valor de 17 430 Da, é bastante semelhante ao valor de massa molecular obtido por electroforese em gel de poliacrilamida e coincide com os valores reportados para as restantes NORC conhecidas [2-4].

## 3. Caracterização Espectroscópica

### 3.1. Espectroscopia de UV/visível

O espectro de UV/visível da NOR de *Ps. nautica* no estado oxidado apresenta um valor de absorção máximo da banda do Soret a 411 nm e outra banda a 526 nm. (ver figura II.3.1 e tabela II.3.3). Verificou-se a ausência da banda de fraca absorção a 595 nm observada nas restantes cNOR's e atribuída ao hemo  $b_3$  em configuração de spin alto [2, 4, 5].



**Figura II.3.1.** Espectros de UV/visível da NOR de *Ps. nautica* em tampão 100 mM KPi pH=7. (—) oxidada, (—) reduzida com ditionito de sódio. Em inserção encontra-se uma expansão da zona das bandas  $\alpha$  e  $\beta$ .

A redução com ditionito de sódio provoca um deslocamento da banda do Soret para 420 nm e o aparecimento das bandas  $\alpha$  e  $\beta$ , a 551 nm, com um ombro a 558 nm e a 521 nm, respectivamente. O comprimento de onda do máximo da banda  $\alpha$  é típico de hemo do tipo *c* e o ombro a 558 nm denuncia a presença de um hemo do tipo *b* em configuração de spin baixo.

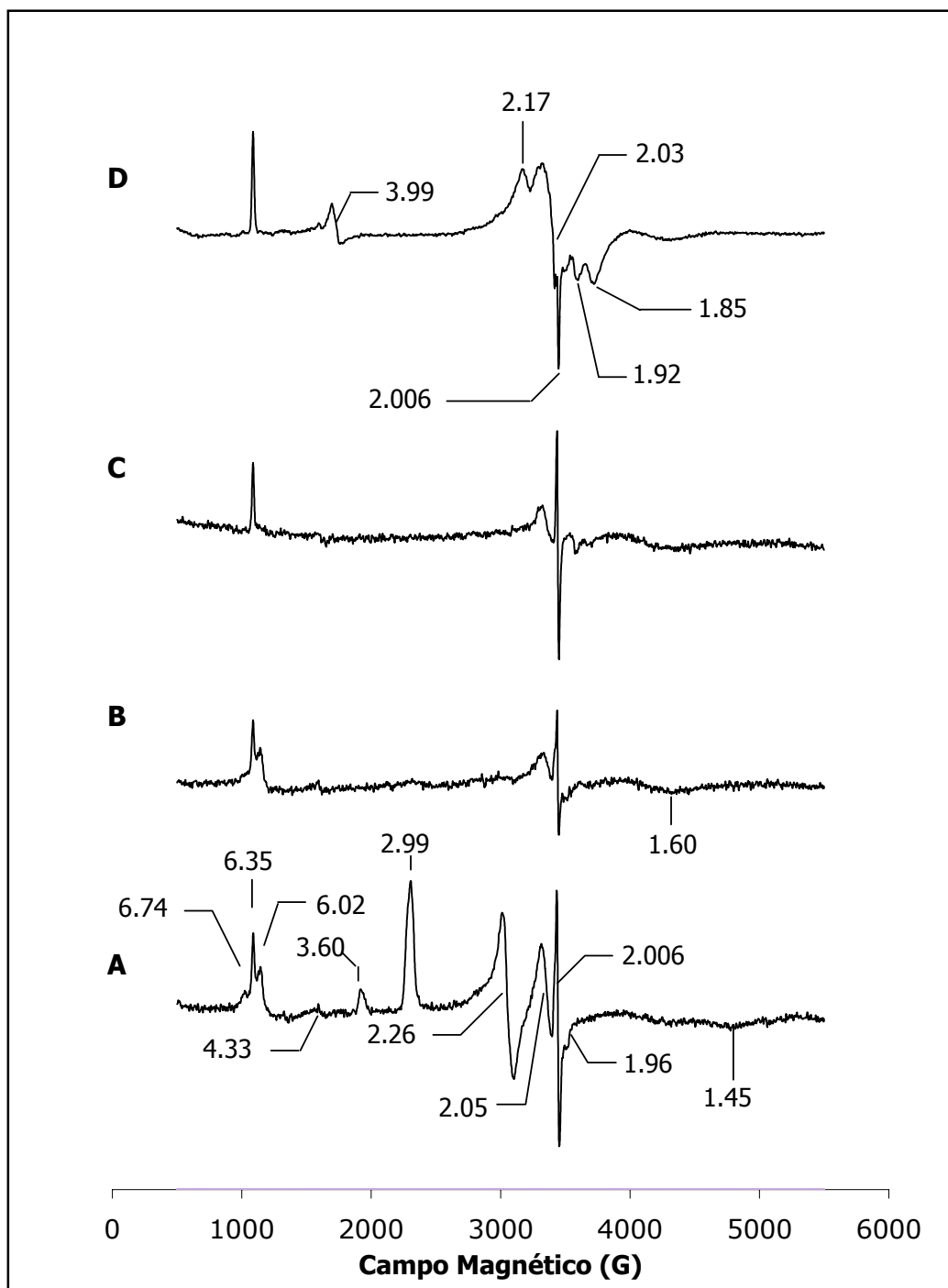
**Tabela II.3.3.** Máximos de absorção do espectro de UV/visível da NOR de *Ps. nautica* a pH=7.0 nos estados oxidado e reduzido. Entre parêntesis encontra-se o valor de comprimento de onda do “ombro” existente na banda  $\alpha$ .

Estado	Máximos de Absorção (nm)
Oxidado	411, 526
Reduzido	420, 521, 551 (558)

### 3.2. Espectroscopia de RPE

No espectro de RPE da NOR oxidada de *Ps. nautica* (figura II.3.2.A) três conjuntos de sinais podem ser observados. Dois deles correspondem a sistemas de spin baixo ( $S=1/2$ ) e um terceiro a um sistema de spin alto ( $S=5/2$ ). O conjunto de sinais altamente anisotrópico, do qual apenas se consegue observar o valor de  $g_{\max}=3.60$  deverá corresponder, de acordo com os estudos realizados nas restantes cNOR's ao hemo *c* em configuração de spin baixo da NORC. O outro conjunto de sinais de spin baixo com valores de  $g_{\max}=2.99$ ,  $g_{\text{med}}=2.26$  e  $g_{\min}\approx 1.45$  corresponde ao hemo *b* em configuração de spin baixo. O conjunto de sinais de spin alto apresentam valores de  $g=6.74$ ,  $6.35$  e  $6.02$ . Os valores de  $g=6.74$  e  $6.02$  deverão corresponder a alguma fracção do hemo  $b_3$  que se encontra desacoplada do  $\text{Fe}_B$ . No entanto, estes representam apenas uma pequena fracção do número total de spins presentes na amostra. À semelhança das restantes NOR's, os ferros que fazem parte do centro catalítico da enzima não são visíveis por espectroscopia de RPE. Neste espectro é possível ainda observar dois sinais com valores de  $g=2.05$  e  $2.006$ . Sinais semelhantes foram reportados nas restantes cNOR's, mas a sua intensidade e presença dependia, nesse caso da preparação [2-4]. No caso da NOR de *Ps. nautica* os sinais com valores de  $g=2.05$  e  $2.006$  podem ser observados no espectro da forma oxidada das preparações da NOR obtidas de diferentes purificações.





**Figura II.3.2.** Espectros de RPE da NOR de *Ps. nautica* em tampão 100 mM KPi, pH=7, 0.05% DM, 0.01% FE. **A.** Forma oxidada, **B.** NOR reduzida com ascorbato de sódio e DAD, **C.** Forma totalmente reduzida com ditionito de sódio, **D.** Forma reduzida incubada com NO. Condições experimentais: frequência da micro-onda, 9.65 GHz; temperatura, 12 K; número de scans, 4; ganho,  $1 \times 10^5$ ; modulação da amplitude, 5 Gpp; potência da micro-onda, 0.2 mW (Excepto para o espectro D em que a potência foi de 6.325 mW. No entanto, o espectro apresentado em D encontra-se corrigido para a potência de 0.2 mW).

No espectro de RPE da NOR de *Pa. denitrificans* é possível observar um sinal com  $g=2.009$  [2], o qual foi atribuído ao  $Fe_B$  do centro binuclear, numa configuração de spin alto. Girsch e De Vries assumiram que o ferro não hémico apresenta uma geometria de coordenação tetraédrica ou octaédrica e que a interação de Zeeman domina o Hamiltoniano de spin. Neste caso, os parâmetros E e D apresentam valores baixos quando comparados com a interação de Zeeman. Segundo estes autores, o sinal com  $g=2.009$  teria origem numa transição  $M_s=1/2 \rightleftharpoons M_s=-1/2$ . Para este sinal foi excluída a possibilidade de ser originado por um radical orgânico, já que não se encontra saturado à potência de 200 mW.

Ao sinal com valor de  $g=2.006$  do espectro de RPE da NOR oxidada de *Ps. nautica* poderia ser atribuída a mesma origem do sinal a  $g=2.009$  da NOR de *Pa. denitrificans*. No entanto, no caso de *Ps. nautica* o sinal a  $g=2.006$  é rapidamente saturado pelo aumento de potência, e apresenta alguma estrutura, podendo ser originado por um radical orgânico, possivelmente de um resíduo de aminoácido. A quantificação deste sinal através da sua simulação resulta em menos de 0.1 spins/proteína. Um sinal de radical semelhante ao da NOR de *Ps. nautica* pode ser observado nos espectros de RPE de diversas proteínas hémicas (nomeadamente no espectro de RPE da CCP de *Ps. stutzeri*).

A quantificação do número de spins por proteína correspondente aos dois sinais de hemo em configuração de spin baixo, encontra-se na tabela II.3.4.

**Tabela II.3.4.** Valores de  $g$  e quantificação do número de spins por proteína, das ressonâncias observadas no espectro de RPE da NOR oxidada de *Ps. nautica*.

Sinal	Valores de $g$	Spins/proteína
Hemo $b$ spin baixo	2.99, 2.26 e 1.45	0.9
Hemo $c$ spin baixo	3.6	0.7
Hemo $b_3$	6.74 e 6.02	—

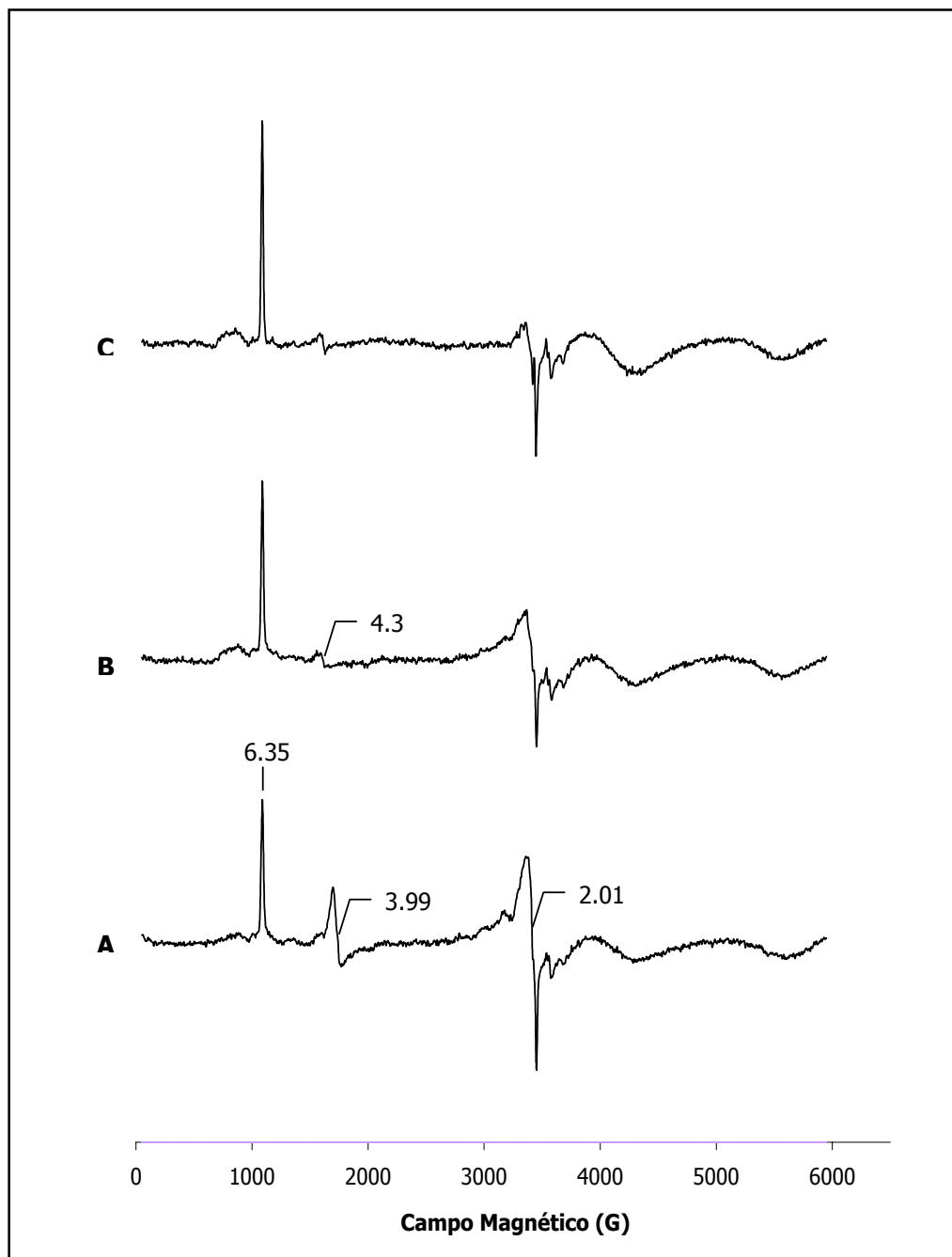
A quantificação do sinal correspondente ao hemo  $b$  foi feita a partir de uma simulação com os seguintes parâmetros:  $g_{\text{máx}}=2.997$ ,  $g_{\text{med}}=2.255$  e  $g_{\text{min}}=1.45$ . A quantificação do sinal altamente anisotrópico correspondente ao hemo  $c$  foi realizada pelo método de Aasa e Vangard [6], modificado segundo De Vries e Albracht [7]. Para tal, determinou-se a razão entre as áreas dos sinais correspondentes ao valor de  $g_{\text{máx}}$  do hemo  $b$  e do hemo  $c$ , corrigidas

pelos respectivos factores  $T_{av}$  ( $T_{av}=2.437$  para o sinal do hemo *c* e  $T_{av}=10.465$  para o sinal do hemo *b*). Os valores obtidos reflectem uma estequiometria de 1 hemo *c*: 1 hemo *b* em configuração de spin baixo.

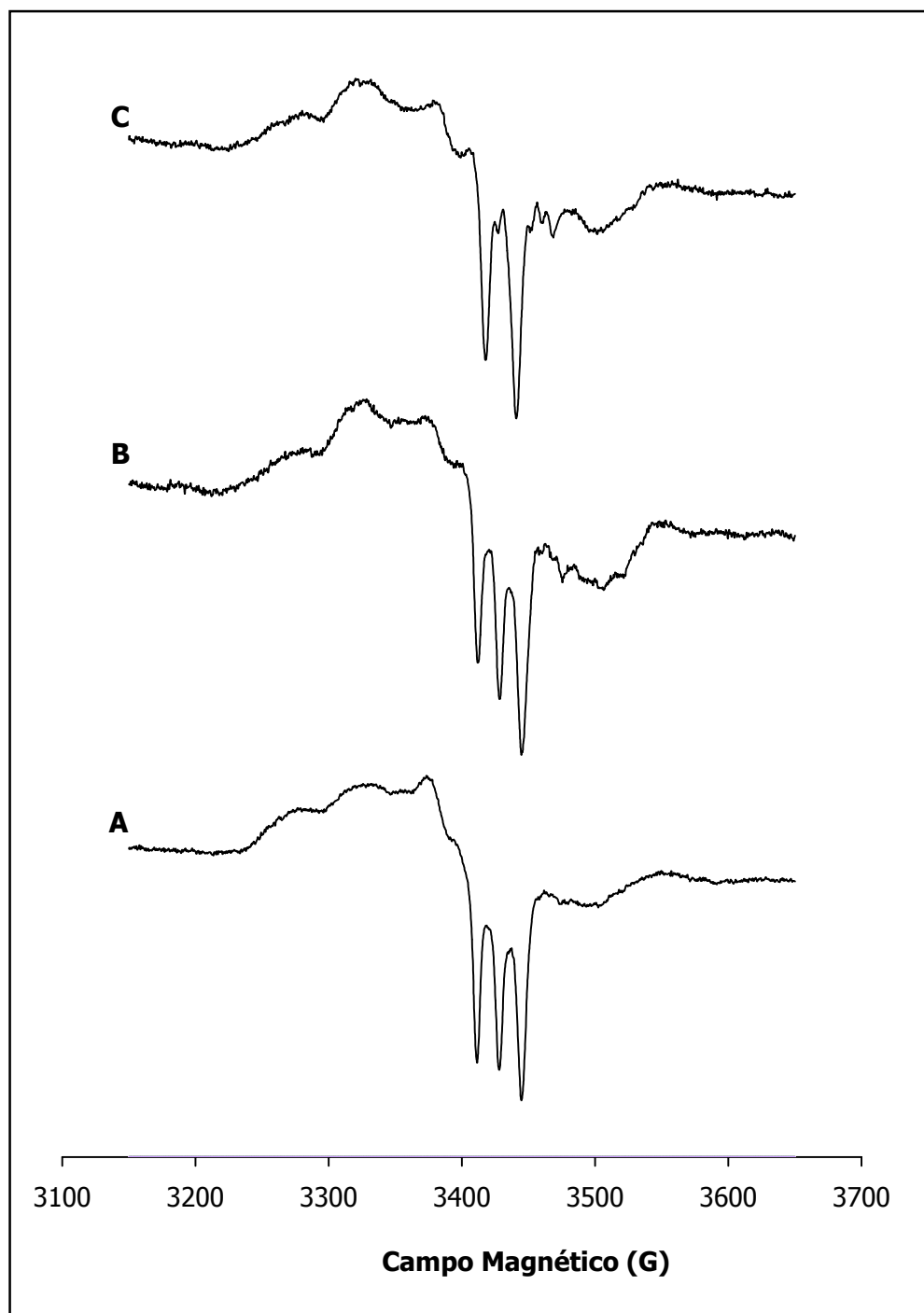
A redução da NOR de *Ps. nautica* com ascorbato de sódio (1 mM) e DAD (10  $\mu$ M), faz com que a maioria dos sinais observados na amostra nativa deixem de ser visíveis no espectro de RPE (figura II.3.2.B). Apenas se observa o conjunto de sinais correspondentes ao sistema de spin alto ( $S=5/2$ ) com valores de  $g=6.74$ ,  $6.35$  e  $6.02$  e os sinais a campo alto, com valores de  $g=2.05$  e  $2.006$ , embora estes últimos tenham perdido alguma intensidade. Neste estado de oxidação, os hemos em configuração de spin baixo encontram-se reduzidos ( $S=0$ ). A fracção de hemo  $b_3$  visível no espectro da proteína nativa parece continuar oxidada (ou pelo menos parcialmente oxidada). A julgar pelos potenciais formais de oxidação-redução da NOR de *Pa. denitrificans* (+310 mV para o hemo *c*, +345 mV para o hemo *b*, + 320 mV para o  $Fe_B$  e +60 mV para o hemo  $b_3$  [8]), o  $Fe_B$  também deveria estar no estado reduzido. Neste caso, com base no modelo catalítico proposto [9, 10], seria de esperar a perda do acoplamento entre o  $Fe_B$  e o hemo  $b_3$ . O  $Fe_B$  continuaria a não ser observável por espectroscopia de RPE por se encontrar reduzido ( $S=2$ ). No entanto, não se observa aumento de intensidade do sinal correspondente ao sistema de spin alto, como seria de esperar se houvesse perda de acoplamento, mantendo-se este no estado  $Fe^{3+}$ . Este facto pode ser justificado por algum grau de redução do hemo  $b_3$ , o que é plausível tendo em conta que o seu potencial formal de oxidação-redução na NOR de *Pa. denitrificans* (de cerca de 60 mV) é semelhante ao do ascorbato de sódio.

A redução da NOR de *Ps. nautica* com ditionito de sódio (1 mM) provoca o desaparecimento dos sinais com  $g=6.74$  e  $6.02$ , mantendo-se apenas os sinais com valores de  $g=6.35$  e  $g=2.006$  (figura II.3.2.C). A origem do sinal com valor de  $g=6.35$  é desconhecida, uma vez que não é redutível e não parece ser um sinal com valor de spin inteiro (não é visível qualquer sinal no espectro de RPE do modo paralelo desta amostra). O sinal com  $g=2.006$  além de não desaparecer com a redução até aumenta de intensidade se a NOR de *Ps. nautica* nativa for incubada com ferricianeto de potássio. Assim parece ser um sinal proveniente de uma espécie já reduzida na forma nativa da NOR e é pouco provável que corresponda ao ferro não hémico como foi proposto por Girsch e De Vries.

A incubação da NOR de *Ps. nautica* totalmente reduzida com o seu substrato, o NO (figura II.3.2.D e II.3.3.A), provoca o aparecimento, no espectro de RPE de dois tipos de sinais.



**Figura II.3.3.** Efeito do NO nos espectros de RPE da NOR de *Ps. nautica* reduzida com ditionito de sódio. **A.** Incubada com NO, **B.** Incubada com  $\text{NO}_2^-$  para produção de NO *in situ* **C.** Incubada com  $^{15}\text{NO}_2^-$  para produção de  $^{15}\text{NO}$  *in situ*. Condições experimentais: frequência da micro-onda, 9.65 GHz; temperatura, 12 K; número de scans, 4; ganho,  $1 \times 10^5$ ; modulação da amplitude, 5 Gpp; potência da micro-onda, 50 mW.



**Figura II.3.4.** Efeito do NO nos espectros de RPE da NOR de *Ps. nautica* reduzida com ditionito de sódio. **A.** Incubada com NO, **B.** Incubada com  $\text{NO}_2^-$  para produção de NO *in situ* **C.** Incubada com  $^{15}\text{NO}_2^-$  para produção de  $^{15}\text{NO}$  *in situ*. Condições experimentais: frequência da micro-onda, 9.65 GHz; temperatura, 77 K; número de scans, 1; ganho,  $1 \times 10^5$ ; modulação da amplitude, 2 Gpp; potência da micro-onda, 20 mW.

O primeiro, com  $g=3.99$ , deverá corresponder a um complexo  $\text{Fe}_B(\text{III}) - \text{NO}$  com  $S=3/2$ , no qual o  $\text{Fe}_B$  em configuração de spin alto ( $S=5/2$ ) se encontra antiferromagneticamente acoplado a  $\text{NO}^-$  ( $S=1$ ). O segundo, um tripleto, centrado a  $g=2$ , é típico de um hemo no estado reduzido ligado a NO (figura II.3.4.A). Este sinal é explicado pela sobreposição de duas espécies hémicas ligadas a NO, uma penta e outra hexacoordenada [11-13].

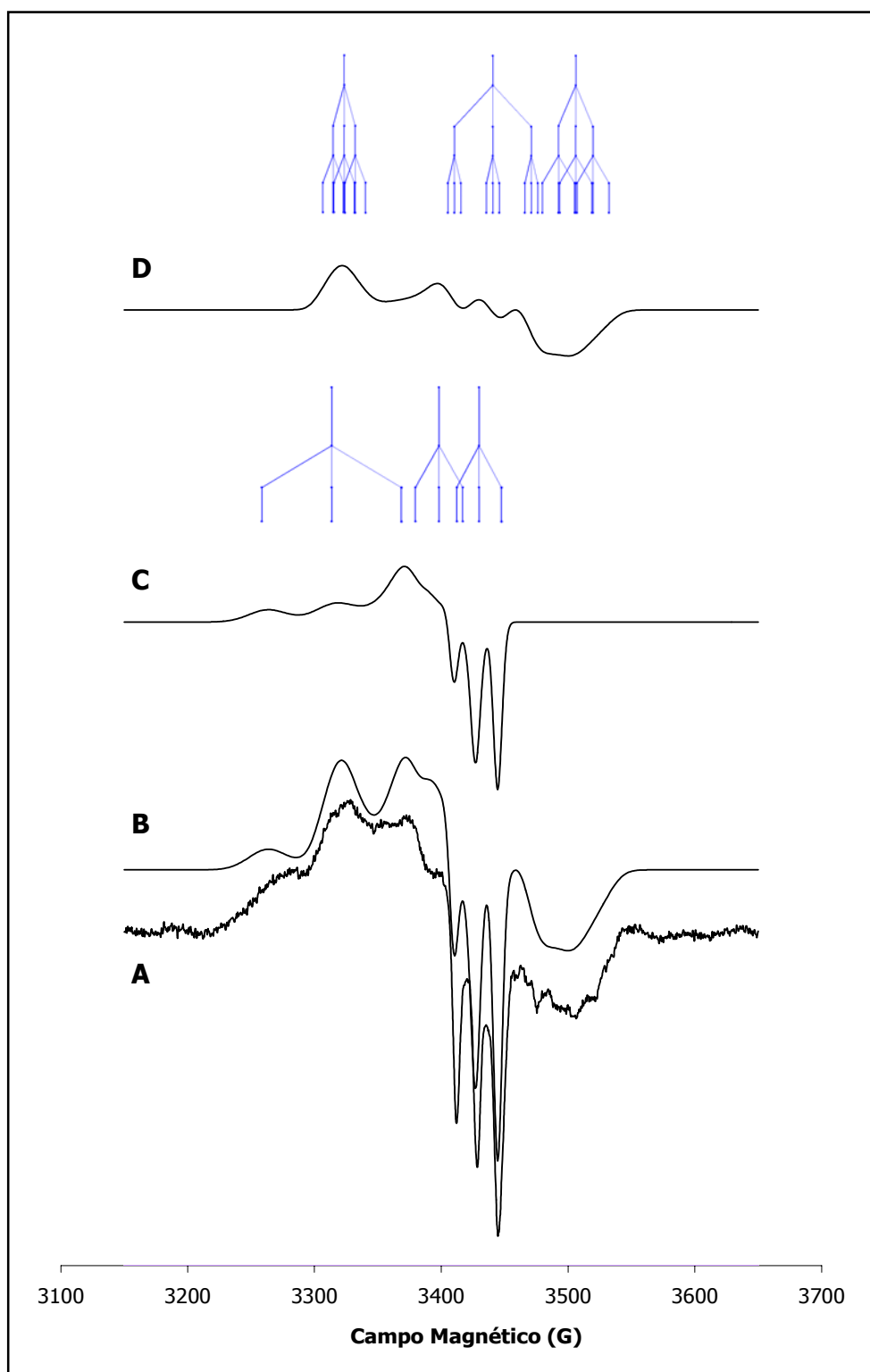
O espectro da figura II.3.4.B corresponde à incubação da NOR de *Ps. nautica* totalmente reduzida com nitrito de sódio para produção de NO *in situ*. Apesar de muito semelhante ao espectro da NOR incubada com NO gás, o sinal a  $g=3.99$  não é visível (ver figura II.3.3.B). Uma outra diferença significativa é a forma do tripleto centrado a  $g=2$ , o qual parece ter percentagens diferentes, em relação ao sinal da figura II.3.3.A, de hemo penta e hexacoordenado ligado a NO a contribuir para o sinal obtido. Com o objectivo de determinar os parâmetros espectroscópicos associados a estas espécies, incubou-se a NOR reduzida com  $^{15}\text{NO}_2^-$  (figura II.3.4.C, tabela II.3.5). As simulações das espécies hémicas ligadas a NO, penta e hexacoordenada, bem como a simulação global sobreposta ao espectro experimental encontram-se nas figuras II.3.5 (para a NOR incubada com  $\text{NO}_2^-$ ) e II.3.6 (para a NOR incubada com  $^{15}\text{NO}_2^-$ )<sup>1</sup>. A simulação da figura II.3.5.B foi obtida com os parâmetros apresentados na tabela II.3.5 assumindo uma percentagem de 43% de espécie hexacoordenada e 57% de espécie pentacoordenada. O espectro da figura II.3.6.A só pôde ser simulado pela curva da figura II.3.6.B assumindo a existência de uma pequena percentagem de espécie hexacoordenada ligada a  $^{14}\text{NO}$  (14%). Assim, este espectro foi obtido assumindo as seguintes percentagens: 52% de espécie pentacoordenada ligada a  $^{15}\text{NO}$ , 34% de espécie hexacoordenada ligada a  $^{15}\text{NO}$  e 14% de espécie hexacoordenada ligada a  $^{14}\text{NO}$ . A existência de  $^{14}\text{NO}$  nesta amostra poderá ser proveniente da própria enzima na forma em que foi purificada (há que ter em conta que o número de spins correspondentes ao sinal de hemo ligado a NO é, apesar de tudo, bastante baixo: cerca de 0.2 spins/proteína)

---

<sup>1</sup> As simulações foram feitas tendo em conta a razão giromagnética de 1.403 entre o  $^{14}\text{N}$  e o  $^{15}\text{N}$  que afecta as constantes hiperfinas quando se substitui o  $^{14}\text{N}$  ( $I=1$ ) por  $^{15}\text{N}$  ( $I=1/2$ .)

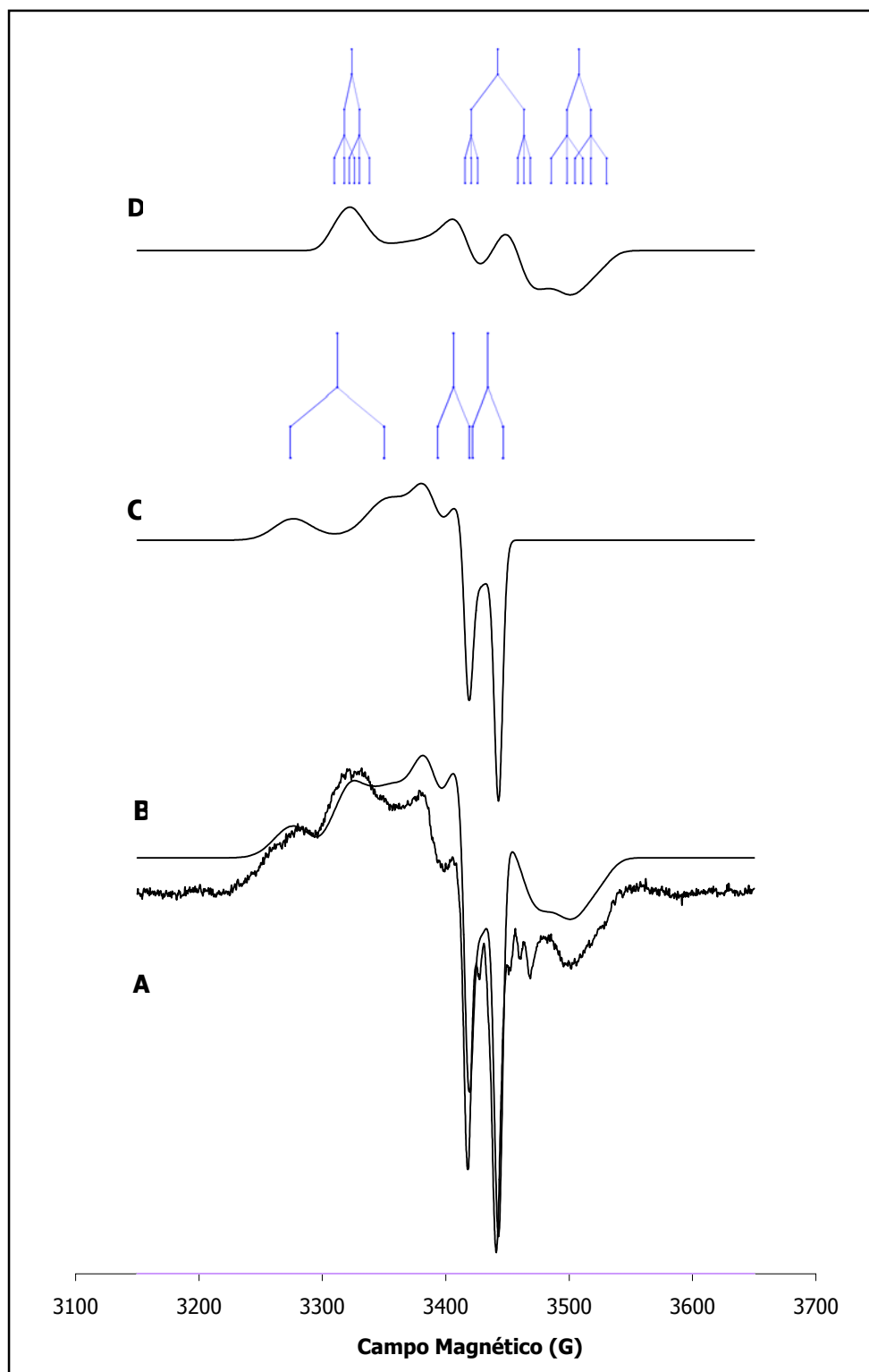
**Tabela II.3.5.** Parâmetros usados nas simulações do sinal hemo-NO dos espectros de RPE da NOR de *Ps. nautica*.

	Parâmetro	g	Largura de linha	Constantes Hiperfinas (G)			
				<sup>14</sup> NO		<sup>15</sup> NO	
				NO	Histidina	NO	Histidina
<b>Espécie Hexacoordenada</b>	z	2.075	17	8.6	8.0	12.0	8.0
	y	2.005	20	30.0	5.0	42.0	5.0
	x	1.968	22	13.5	12.5	19.0	12.5
<b>Espécie Pentacoordenada</b>	z	2.082	35	53.0	—	74.0	—
	y	2.026	33	18.0	—	25.0	—
	x	2.010	8	17.0	—	24.0	—
<b>Spin do núcleo</b>				1	1	1/2	1



**Figura II.3.5.** Simulações das espécies hêmicas ligadas a  $^{14}\text{NO}$ . **A.** Espectro experimental (espectro B da figura II.3.4.), **B.** Simulação global, **C.** Simulação da espécie pentacoordenada, **D.** Espécie hexacoordenada.





**Figura II.3.6.** Simulações das espécies hêmicas ligadas a  $^{15}\text{NO}$ . **A.** Espectro experimental (espectro C da figura II.3.4.), **B.** Simulação global, **C.** Simulação da espécie pentacoordenada, **D.** Espécie hexacoordenada.

## 4. Bibliografia

1. **Berry, E. A. e Trumpower, B. L.** (1987) "Simultaneous determination of hemes *a*, *b*, and *c* from pyridine hemochrome spectra." *Anal Biochem* **161**, 1-15
2. **Girsch, P. e de Vries, S.** (1997) "Purification and initial kinetic and spectroscopic characterization of NO reductase from *Paracoccus denitrificans*." *Biochim Biophys Acta* **1318**, 202-216
3. **Kastrau, D. H., Heiss, B., Kroneck, P. M. e Zumft, W. G.** (1994) "Nitric oxide reductase from *Pseudomonas stutzeri*, a novel cytochrome *bc* complex. Phospholipid requirement, electron paramagnetic resonance and redox properties." *Eur J Biochem* **222**, 293-303
4. **Sakurai, N. e Sakurai, T.** (1997) "Isolation and characterization of nitric oxide reductase from *Paracoccus halodenitrificans*." *Biochemistry* **36**, 13809-13815
5. **Field, S. J., Prior, L., Roldan, M. D., Cheesman, M. R., Thomson, A. J., Spiro, S., Butt, J. N., Watmough, N. J. e Richardson, D. J.** (2002) "Spectral properties of bacterial nitric-oxide reductase: resolution of pH-dependent forms of the active site heme *b3*." *J Biol Chem* **277**, 20146-20150
6. **Aasa, R. e Vanngard, T.** (1975) "EPR signal intensity and powder shapes: a reexamination." *Journal of Magnetic Resonance* **19**, 308-315
7. **De Vries, S. e Albracht, S. P. J.** (1979) "Intensity of highly anisotropic low-spin heme EPR signals." *Biochim Biophys Acta* **546**, 334-340
8. **Gronberg, K. L., Roldan, M. D., Prior, L., Butland, G., Cheesman, M. R., Richardson, D. J., Spiro, S., Thomson, A. J. e Watmough, N. J.** (1999) "A low-redox potential heme in the dinuclear center of bacterial nitric oxide reductase: implications for the evolution of energy-conserving heme-copper oxidases." *Biochemistry* **38**, 13780-13786
9. **Moenne-Loccoz, P. e de Vries, S.** (1998) "Structural characterization of the catalytic high-spin heme *b* of nitric oxide reductase: a resonance Raman study." *J Am Chem Soc* **120**, 5147-5152
10. **Moenne-Loccoz, P., Richter, O. M. H., Huang, H., Wasser, I. M., Ghiladi, R. A., Karlin, K. D. e de Vries, S.** (2000) "Nitric oxide reductase from *Paracoccus denitrificans* contains an oxo-bridged heme/non-heme diiron center." *J Am Chem Soc* **122**, 9344-9345

11. **Stone, J. R., Sands, R. H., Dunham, W. R. e Marletta, M. A.** (1995) "Electron paramagnetic resonance spectral evidence for the formation of a pentacoordinate nitrosyl-heme complex on soluble guanylate cyclase." *Biochem Biophys Res Comm* **207**, 572-577
12. **Tsai, A., Wei, C. e Kulmacz, R. J.** (1994) "Interaction between nitric oxide and prostaglandin H synthase." *Arch Biochem Biophys* **313**, 367-372
13. **Van Doorslaer, S., Dewilde, S., Kiger, L., Nistor, S. V., Goovaerts, E., Marden, M. C. e Moens, L.** (2003) "Nitric Oxide Binding Properties of Neuroglobin: A characterization by EPR and Flash Photolysis." *J Biol Chem* **278**, 4919-4925



## *CAPÍTULO 4*

---

---

# Sequenciação e Modelação da Estrutura Tridimensional

---

---

## Capítulo 4 – Sequenciação e Modelação da Estrutura Tridimensional

1. Introdução .....	197
2. Sequenciação do Gene que codifica para a NOR de <i>Ps. nautica</i> .....	197
2.1. Aplicação da Técnica de “ <i>Genome Walking</i> ” .....	201
2.1.1. Introdução.....	201
2.1.2. Sequenciação no sentido N-terminal da subunidade NORB .....	201
2.1.2.1. Os Iniciadores.....	201
2.1.2.2. Primeira Reacção de PCR .....	202
2.1.2.3. Segunda Reacção de PCR .....	203
2.1.2.4. Sequência Obtida .....	205
2.1.3. Sequenciação no sentido C-terminal de NORB .....	205
2.1.3.1. Os Iniciadores.....	205
2.1.3.2. Primeira Reacção de PCR .....	206
2.1.3.3. Segunda Reacção de PCR .....	207
2.1.3.4. Sequência Obtida .....	209
2.1.4. Sequenciação da NORC .....	209
2.1.4.1. Primeira Reacção de PCR .....	211
2.1.4.2. Segunda Reacção de PCR .....	212
2.1.3.4. Sequência Obtida .....	213
3. Sequência da Redutase do Óxido Nítrico de <i>Pseudomonas nautica</i> .....	213
4. Modelo da Estrutura Tridimensional da NORB de <i>Ps. nautica</i> .....	217
5. Bibliografia .....	220

## 1. Introdução

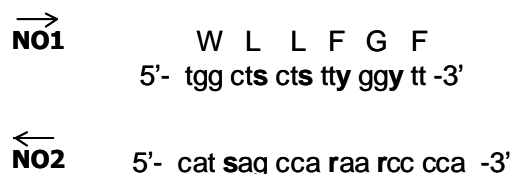
Para a determinação da sequência de ADN dos genes que codificam para cada uma das subunidades da NOR de *Ps. nautica* (genes *norC* e *norB*) seguiu-se a abordagem descrita na primeira parte da tese para a sequenciação da CCP de *Ps. stutzeri*. No entanto, como neste caso não se conhecia nenhum fragmento de sequência, ambos os iniciadores da primeira reacção de PCR foram desenhados a partir da análise comparativa das sequências de aminoácidos das subunidades NORB conhecidas. A partir do primeiro fragmento de sequência de ADN da subunidade NORB, aplicou-se a técnica de “Genome Walking”. Como o gene *norC* se situa a montante do gene *norB*, a totalidade da sequência da subunidade NORC foi obtida por “Genome Walking” a partir da sequência de ADN do gene *norB*.

## 2. Sequenciação do Gene que codifica para a NOR de *Ps. nautica*

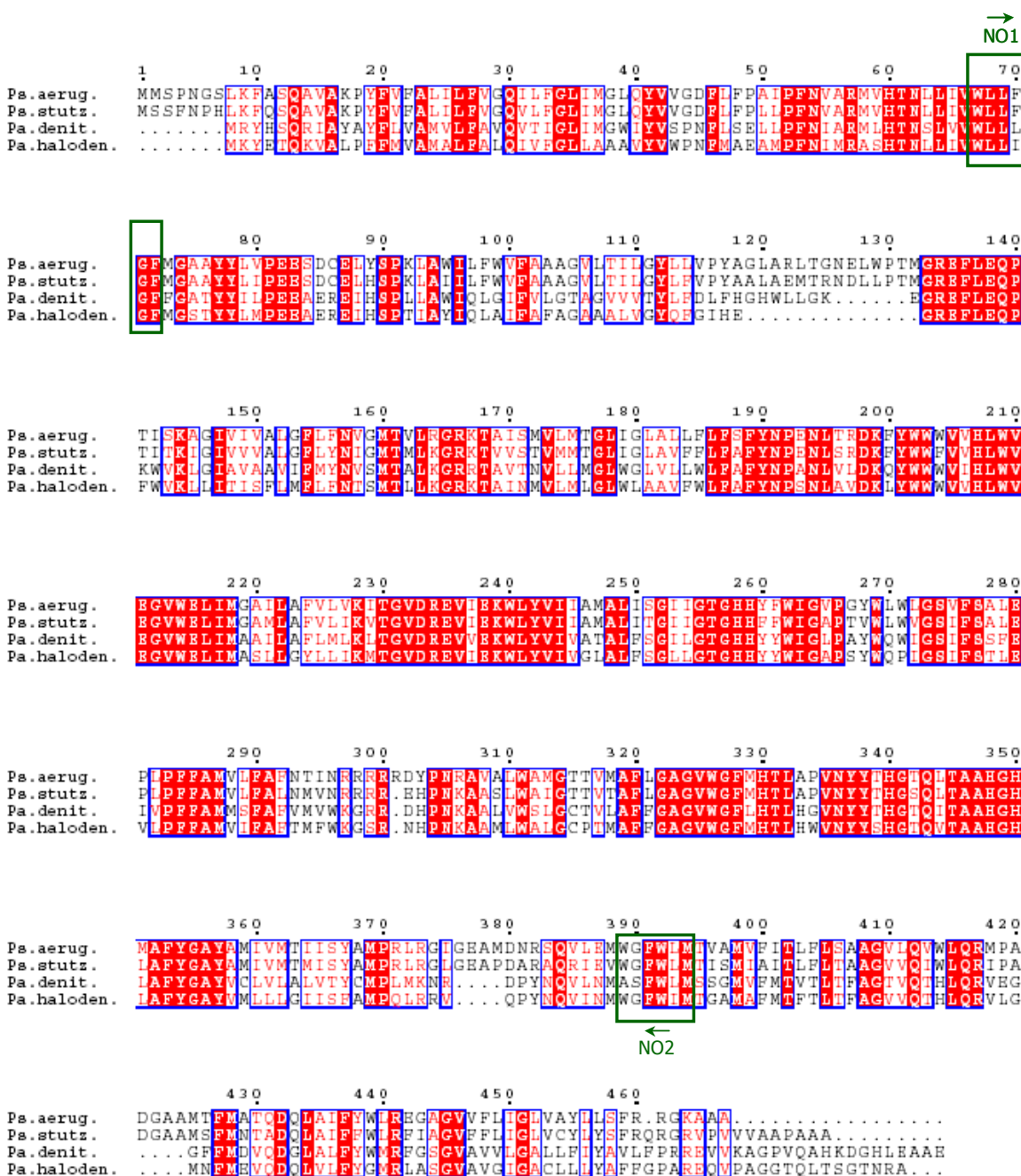
Para a obtenção da sequência de ADN do gene que codifica para a subunidade NORB de *Ps. nautica* começou-se por desenhar um par de oligonucleótidos iniciadores para a amplificação de um fragmento desse gene através da técnica de PCR. Para tal, teve que se recorrer a uma zona bastante conservada das sequências de aminoácidos das restantes NORB's bacterianas. Esses iniciadores, denominados NO1 e NO2, encontram-se marcados na figura II.4.1, a qual ilustra a comparação das sequências de aminoácidos das quatro NORB's bacterianas usadas para verificação de zonas conservadas.

Para diminuir a degenerescência dos iniciadores desenhados calculou-se a frequência dos codões que codificam para cada aminoácido noutras proteínas isoladas de *Ps. nautica*, cuja sequência de ADN era conhecida. Ao desenhar os iniciadores não foram considerados os codões com uma frequência de menos de 10% em todas as sequências analisadas.

As sequências dos dois iniciadores são as seguintes:



O iniciador NO2 é o complementar e inverso da sequência de ADN que codifica para a proteína. **s**, **r** e **y** são degenerescências que significam **g+c**, **a+g** e **c+t**, respectivamente.



**Figura II.4.1.** Comparação das sequências de aminoácidos das subunidades NORB das redutases do óxido nítrico bacterianas isoladas de *Ps. aeruginosa* [1], *Ps. stutzeri* [2], *Pa. denitrificans* [3] e *Pa. halodenitrificans* [4], para a verificação de zonas conservadas. As zonas onde foram desenhados os dois oligonucleótidos iniciadores para a reacção de PCR, NO1 e NO2, encontram-se marcadas com caixas de cor verde.



Uma vez desenhado o par de iniciadores, isolou-se o ADN molde para a reacção de PCR, a partir de uma cultura da bactéria *Ps. nautica* (ver Apêndice C). A reacção de PCR foi preparada com 50 ng de ADN molde num volume total de 50 µl (as restantes condições da reacção encontram-se no apêndice C) e decorreu num termociclador com o seguinte programa:

**Passo 1** – Desnaturação inicial da cadeia de ADN a 94°C, durante 5 minutos.

**Passo 2** – Desnaturação de cada ciclo a 94°C, durante 30 segundos.

**Passo 3** – Hibridação a 58°C<sup>1</sup>, durante 1 minuto e 30 segundos.

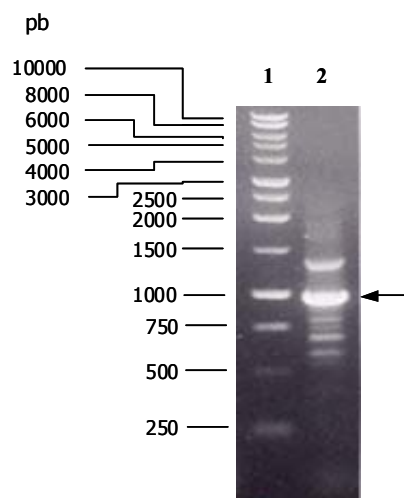
**Passo 4** – Amplificação a 72°C durante 2 minutos.

(Os passos 2 a 4 foram repetidos 35 vezes)

**Passo 5** – Amplificação final a 72°C, durante 10 minutos.

**Passo 6** – Permanência a 4°C em pausa.

Verificou-se o resultado da reacção de PCR através de uma electroforese em gel de 1% de agarose com brometo de etídeo, cuja fotografia se encontra na figura II.4.2.



**Figura II.4.2.** Gel de 1% de agarose do produto da reacção de PCR com os iniciadores NO1 e NO2. **Poços:** 1. Marcador de pesos moleculares 1kB (*Promega*); 2. Produto da Reacção de PCR. A banda assinalada com uma seta apresenta um peso molecular de  $\approx 900$  pb.

Tendo em conta a comparação de sequências da figura II.4.1 o fragmento de ADN esperado deveria ter cerca de 900 pares de bases (pb), correspondendo a uma zona de 300

<sup>1</sup> A temperatura de emparelhamento é escolhida tendo em conta a temperatura de fusão ( $T_m$ ) de cada um dos iniciadores. Neste caso  $T_m$  do NO1=55.6°C e do NO2=58.3°C.

aminoácidos da proteína. A banda assinalada na figura II.4.2 apresenta um tamanho de aproximadamente 900 pb, pelo que foi extraída do gel e purificada para ligação ao vector pGEM-T EASY (*Promega*). O ADN ligado ao plasmídeo foi transformado em células competentes *Epicurian Coli XL1-Blue*, as quais foram crescidas em meio LB com ampicilina, X-Gal e IPTG para selecção das colónias que adquiriram o plasmídeo contendo a inserção através da sua cor branca (ver Apêndice C). Estas foram crescidas em meio líquido LB contendo ampicilina. O ADN plasmídico foi isolado e sequenciado. As sequências de ADN e aminoácidos obtidas para a NORB de *Ps. nautica* a partir do fragmento da reacção de PCR com os iniciadores NO1 e NO2 encontra-se na figura II.4.3.

```

tggtgctgttccggttcacatgggcgccacactactacatgggtccggaagaagcccagacc
W L L F G F M G A T Y Y M V P E E A Q T
gaactgcacagccccctgctggcgtggattctgttctgggtgttcgcggcagctggcacg
E L H S P L L A W I L F W V F A A A G T
ctgaccatcctgggtacctgtttgtggactacgccaccttggcagaagtcaccatgaac
L T I L G Y L F V D Y A T L A E V T M N
aagttgctacccaccatgggcccgggagttcctggagcaaccacgataaccaagatcggg
K L L P T M G R E F L E Q P T I T K I G
atcgccgtggtcgtgggtggcggttcctctataacatcgccatgaccgctgaaaggccgc
I A V V V V A F L Y N I A M T A L K G R
aagaccgtggtcaacatcgctactgatcaccggcctggtaggcctggccgtattgtggctg
K T V V N I V L I T G L V G L A V L W L
ttctccttctacaaccccggaacctggccaccgacaagtacttctggtgggttgggtc
F S F Y N P G N L A T D K Y F W W F V V
cacctgtgggtagaaggcgtgtgggaactgatcatgggtgccattctggcctatgtgttg
H L W V E G V W E L I M G A I L A Y V L
atcaagctcacaggtgtagaccgcgaagtaatcgagaagtggctgtacgtgatcatcgcc
I K L T G V D R E V I E K W L Y V I I A
atggcgctgattaccggcatcatcggtaccgggcaccacttcttctggatcgggccgccc
M A L I T G I I G T G H H F F W I G P P
gagtactggctctggtgggttctgtgttctctgcactggaaccgcttccgttcttcatg
E Y W L W L G S V F S A L E P L P F F M
atggtggtccttcgccttcaacatgatcaaccgtcgccgcccgaaccacccgaacaaggcc
M V V F A F N M I N R R R R N H P N K A
gcatgctgtggccatgggtacaaccgtcatggcattcctgggcgctggcggtgtggggc
A M L W A M G T T V M A F L G A G V W G
ttctgcacaccctgggtcgggtgaactgggtacacccatggtagccagattaccgcagcc
F L H T L A P V N W Y T H G S Q I T A A
cacggccacatggccttctatggcgctacgtaatgattgtactgaccatcatttctac
H G H M A F Y G A Y V M I V L T I I S Y
gccatgccaatcatgcgcggctcgcccctacggcaacagcaataccgctcagattgtggaa
A M P I M R G R P Y G N S N T A Q I V E
atgtggggccttctgggtcatg
M W G F W L M

```

**Figura II.4.3.** Sequência de ADN da NORB de *Ps. nautica* e respectivos aminoácidos por ela codificados, obtida através do fragmento amplificado pela reacção de PCR com os iniciadores NO1 e NO2 (destacados por caixas).

## 2.1. Aplicação da Técnica de “*Genome Walking*”

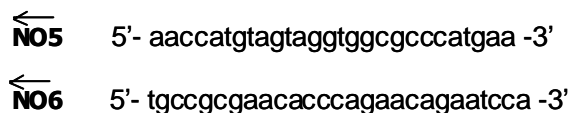
### 2.1.1. Introdução

Para a aplicação da técnica de “*Genome Walking*” na sequenciação da NOR de *Ps. nautica*, foram construídas quatro bibliotecas genómicas a partir do ADN cromossómico da bactéria cortado com diferentes enzimas de restrição (*EcoRV*, *DraI*, *PvuII* e *StuI*). Aos fragmentos resultantes liga-se um adaptador (ver Apêndice C) fornecido pelo fabricante do kit (*Clontech*). Realizam-se então duas reacções de PCR consecutivas, sendo utilizado, em cada uma delas, um iniciador específico para a sequência de ADN do gene em estudo e outro específico para o adaptador.

### 2.1.2. Sequenciação no sentido N-terminal da subunidade NORB

#### 2.1.2.1. Os Iniciadores

Para determinar a sequência de ADN a montante da zona conhecida, desenharam-se dois iniciadores na cadeia complementar à codificante:



em que os iniciadores sintetizados são complementares e inverso da sequência de ADN que codifica para a proteína.

Na figura II.4.4 é possível observar a localização destes dois iniciadores na sequência de ADN conhecida.

←  
NO5

tggctgctgttcggc **ttcatgggcgccacactactacatgggtt** ccggaagaagcccagacc  
 W L L F G F M G A T Y Y M V P E E A Q T

←  
NO6

gaactgcacagccccctgctggcg **tggaattctgttctgggtgttcgcggca** gctggcacg  
 E L H S P L L A W I L F W V F A A A G T  
 ctgaccatcctgggctacctgtttgtggactacgccaccttggcagaagtcacccatgaac  
 L T I L G Y L F V D Y A T L A E V T M N  
 aagttgctacccaccatgggcccgggagttcctggagcaaccacgataaccaagatcggt  
 K L L P T M G R E F L E Q P T I T K I G  
 atcgccgtggtcgtgggtggcggttcctctataacatcgccatgaccgctgaaagggccg  
 I A V V V V A F L Y N I A M T A L K G R  
 aagaccgtggtcaacatcgctactgatcaccggcctggtaggcctggccgtattgtggctg  
 K T V V N I V L I T G L V G L A V L W L  
 ttctccttctacaaccccggaacctggccaccgacaagtacttctggtggtttgtggctc  
 F S F Y N P G N L A T D K Y F W W F V V  
 cacctgtgggtagaaggcgtgtgggaactgatcatgggtgccattctggcctatgtgttg  
 H L W V E G V W E L I M G A I L A Y V L  
 atcaagctcacaggtgtagaccgcgaagtaatcgagaagtggctgtacgtgatcatcgcc  
 I K L T G V D R E V I E K W L Y V I I A  
 atggcgctgattaccggcatcatcggtaccgggcaccacttcttctggatcgggccgccc  
 M A L I T G I I G T G H H F F W I G P P  
 gactactggctctggctgggttctgtgttctctgcactggaaccgcttccgttcttcatg  
 E Y W L W L G S V F S A L E P L P F F M  
 atgggtggtccttcgccttcaacatgatcaaccgtcgccgcccgaaccacccgaacaaggcc  
 M V V F A F N M I N R R R R N H P N K A  
 gcgatgctgtggccatgggtacaaccgtcatggcattcctgggcgctggcggtgtggggc  
 A M L W A M G T T V M A F L G A G V W G  
 ttctgcacaccctggctccggtgaactgggtacacccatggtagccagattaccgcagcc  
 F L H T L A P V N W Y T H G S Q I T A A  
 cacggccacatggccttctatggcgccctacgtaatgattgtactgaccatcatttctac  
 H G H M A F Y G A Y V M I V L T I I S Y  
 gccatgccaatcatgcgcggctcgcccctacggcaacagcaataccgctcagattgtggaa  
 A M P I M R G R P Y G N S N T A Q I V E  
 atgtggggccttctggctcatg  
 M W G F W L M

**Figura II.4.4.** Localização, na sequência de ADN da NORB de *Ps. nautica*, dos iniciadores NO6 e NO5 para a primeira e segunda reacção de PCR respectivamente, no sentido do N-terminal .

### 2.1.2.2. Primeira Reacção de PCR

Após o isolamento do ADN genómico da bactéria *Ps. nautica* e a construção das livrarias genómicas de acordo com as especificações do fabricante do kit de “Genome Walker” (Clontech) realizou-se a primeira reacção de PCR com os iniciadores NO6 a AP1 (fornecido no kit Clontech).

O programa de PCR encontra-se descrito abaixo:

**Passo 1** – Desnaturação inicial da cadeia de ADN a 94°C, durante 25 segundos.

**Passo 2** – Desnaturação a 94°C, durante 25 segundos.

**Passo 3** – Hibridação e extensão a 78°C<sup>2</sup>, durante 3 minutos.

(Os passos 2 e 3 foram repetidos 7 vezes)

**Passo 4** – Desnaturação a 94°C, durante 25 segundos.

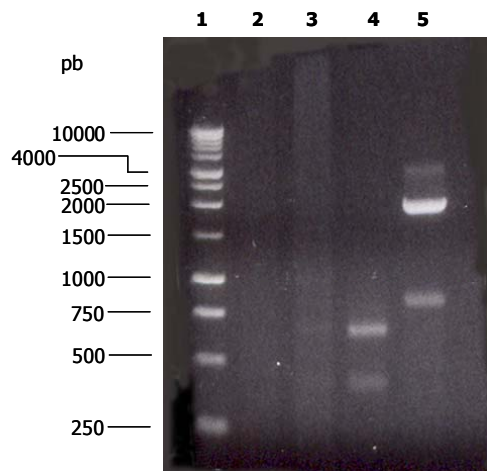
**Passo 5** – Hibridação e extensão a 72°C, durante 3 minutos.

(Os passos 4 e 5 foram repetidos 32 vezes)

**Passo 6** – Amplificação final a 72°C, durante 7 minutos.

**Passo 7** – Permanência a 4°C em pausa.

O resultado da reacção de PCR foi verificado através de uma electroforese em gel de agarose 1.5%, cuja fotografia se encontra na figura II.4.5. Nesta figura é possível observar diversas bandas, havendo já nalguns poços do gel um produto de PCR principal.



**Figura II.4.5.** Gel de 1.5% de agarose da primeira reacção de PCR da técnica de “Genome Walking” no sentido do N-terminal da NORB. **Poços:** 1. Marcador de pesos moleculares 1kB (*Promega*); 2. a 5. Reacções de PCR usando como ADN molde as livrarias genómicas das enzimas *DraI*, *EcoRV*, *PvuII* e *StuI*, respectivamente, 6. Controlo negativo.

### 2.1.2.3. Segunda Reacção de PCR

Na segunda reacção de PCR usou-se como ADN molde uma diluição de 1:50 do resultado da primeira reacção. Usaram-se os iniciadores NO5 e AP2 (fornecido no *kit Clontech*).

<sup>2</sup> Tendo em conta a elevada  $T_m$  do NO6=80.7°C optou-se por usar uma temperatura de emparelhamento inicial de 78°C, visto que acima desta normalmente não se conseguem obter produtos de PCR.

O programa de PCR encontra-se descrito abaixo:

**Passo 1** – Desnaturação inicial da cadeia de ADN a 94°C, durante 25 segundos.

**Passo 2** – Desnaturação a 94°C, durante 25 segundos.

**Passo 3** – Hibridação e extensão a 78°C<sup>3</sup>, durante 3 minutos.

(Os passos 2 e 3 foram repetidos 7 vezes)

**Passo 4** – Desnaturação a 94°C, durante 25 segundos.

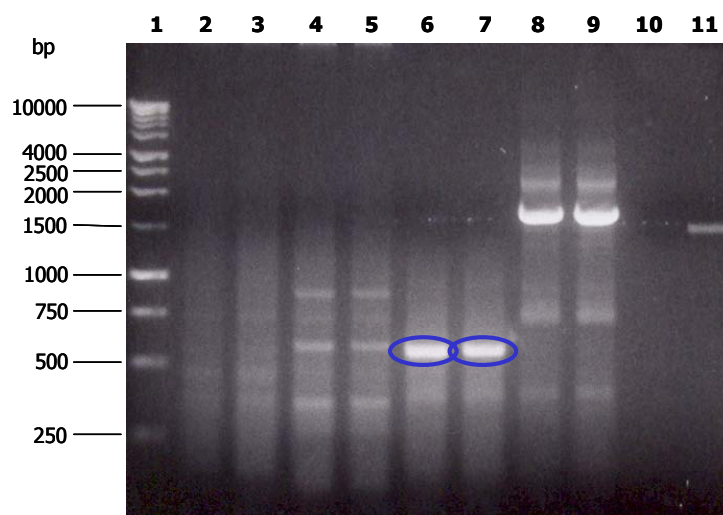
**Passo 5** – Hibridação e extensão a 72°C, durante 3 minutos.

(Os passos 4 e 5 foram repetidos 20 vezes)

**Passo 6** – Amplificação final a 72°C, durante 7 minutos.

**Passo 7** – Permanência a 4°C em pausa.

O resultado da reacção de PCR foi verificado através de uma electroforese em gel de agarose 1.5%, cuja fotografia se encontra na figura II.4.6.



**Figura II.4.6.** Gel de 1.5% de agarose da segunda reacção de PCR da técnica de “*Genome Walking*” no sentido do N-terminal da NORB. **Poços:** 1. Marcador de pesos moleculares 1kB (*Promega*); 2 a 9: reacções de PCR usando como ADN molde as primeiras reacções com as livrarias genómicas da enzima *DraI* (2 e 3), *EcoRV* (4 e 5), *PvuII* (6 e 7) e *StuI* (8 e 9), 10. Controlo negativo, 11. Controlo positivo (livraria de ADN genómico humano com iniciador específico fornecido no kit)

<sup>3</sup> Tendo em conta a  $T_m$  do NO5=75.2°C seguiu-se a regra geral para as temperaturas de emparelhamento.

### 2.1.2.4. Sequência Obtida

As bandas assinaladas no gel da figura II.4.6 (pertencentes à mesma reacção), com um peso molecular de cerca de 600 pb, foram extraídas e o seu ADN purificado, ligado ao vector plasmídico e transformado em células competentes tal como anteriormente. A sequência determinada para o N-terminal da NORB a partir deste fragmento encontra-se na figura II.4.7.

```

atgaaatacgaatctcaaagggcgccatgccctacttcatctttgccctgattctgttt
M K Y E S Q R V A M P Y F I F A L I L F
gccggccagattgtgttcggcctgattctgggtctccagtagctgtcggtgatttcctg
A G Q I V F G L I L G L Q Y V V G D F L
tttcggaaattcctttcaacgttgcgcgatgggtgcataccaacctgctgattgtctgg
F P E I P F N V A R M V H T N L L I V W
ctgctcttcgggttcattggcgccacctactacatgggtt
L L F G F M G A T Y Y M V
    
```

**Figura II.4.7.** Sequência de ADN do N-terminal da NORB de *Ps. nautica* com a respectiva sequência de aminoácidos por ela codificada, obtida através da técnica de “Genome Walking”. A sequência do iniciador NO5 encontra-se destacada por uma caixa.

### 2.1.3. Sequenciação no sentido C-terminal de NORB

#### 2.1.3.1. Os Iniciadores

Para determinar a sequência de ADN a juzante da zona conhecida, desenharam-se dois iniciadores na cadeia codificante:

$\overrightarrow{\text{NO9}}$       5'- ctggtacacccatggttagccagattac -3'  
 $\overrightarrow{\text{NO10}}$      5'- atggcgccctacgtaatgattgtactga -3'

Na figura II.4.8 é possível observar a localização destes dois iniciadores na sequência de ADN conhecida.

```

tggtgctgttgcggttcatgggcgccacctactacatgggtccggaagaagcccagacc
W L L F G F M G A T Y Y M V P E E A Q T
gaactgcacagccccctgctggcggtgattctgttctgggtgttcgcggcagctggcacg
E L H S P L L A W I L F W V F A A A G T
ctgaccatcctgggctacctgtttgtggactacgccaccttggcagaagtcacccatgaac
L T I L G Y L F V D Y A T L A E V T M N
aagttgctaccaccatgggcccgggagttcctggagcaaccacgataaccaagatcggt
K L L P T M G R E F L E Q P T I T K I G
atcgccgtggctggtggcggttcctctataacatcgccatgaccgcgctgaaaggccgc
I A V V V V A F L Y N I A M T A L K G R
aagaccgtgggtcaacatcgactgatcaccggcctggtaggcctggccgtattgtggctg
K T V V N I V L I T G L V G L A V L W L
ttctccttctacaacccccggcaacctggccaccgacaagtacttctggtgggtttgtggtc
F S F Y N P G N L A T D K Y F W W F V V
cacctgtgggtagaaggcggtgtgggaactgatcatgggtgccattctggcctatgtgttg
H L W V E G V W E L I M G A I L A Y V L
atcaagctcacaggtgtagaccgcgaagtaatcgagaagtggctgtacgtgatcatcgcc
I K L T G V D R E V I E K W L Y V I I A
atggcgctgattaccggcatcatcggtaccgggcaccacttcttctggatcggggccgccc
M A L I T G I I G T G H H F F W I G P P
gagtactggctctggctgggttctgtgttctctgactggaaccgcttccggttcttcatg
E Y W L W L G S V F S A L E P L P F F M
atgggtgggtcttgccttcaacatgatcaaccgtcgccgccaaccacccgaacaaggcc
M V V F A F N M I N R R R R N H P N K A
gcgatgctgtgggcatgggtacaaccgtcatggcattcctgggcgctggcggtgtggggc
A M L W A M G T T V M A F L G A G V W G
                                     →
                                     NO9
ttcctgcacaccctgggtccggtgaa<b>ctggtacacccatggtagccagattac</b>cgcagcc
F L H T L A P V N W Y T H G S Q I T A A
                                     →
                                     NO10
caaggccacatggccttct<b>atgggcgcctacgtaatgattgtactga</b>ccatcatttcttac
H G H M A F Y G A Y V M I V L T I I S Y
gccatgccaatcatgcgcggctcgcccctacggcaacagcaataaccgctcagattgtggaa
A M P I M R G R P Y G N S N T A Q I V E
atgtggggccttctggctcatg
M W G F W L M

```

**Figura II.4.8.** Localização na sequência de ADN da NORB de *Ps. nautica*, dos iniciadores NO9 e NO10 para a primeira e segunda reacção de PCR no sentido do C-terminal.

### 2.1.3.2. Primeira Reacção de PCR

Utilizaram-se as bibliotecas genómicas anteriormente construídas para a realização da primeira reacção de PCR com os iniciadores NO9 e AP1.

O programa de PCR usado foi o seguinte:

**Passo 1** – Desnaturação inicial da cadeia de ADN a 94°C, durante 25 segundos.

**Passo 2** – Desnaturação a 94°C, durante 25 segundos.



**Passo 3** – Hibridação e extensão a 72°C<sup>4</sup>, durante 3 minutos.

(Os passos 2 e 3 foram repetidos 7 vezes)

**Passo 4** – Desnaturação a 94°C, durante 25 segundos.

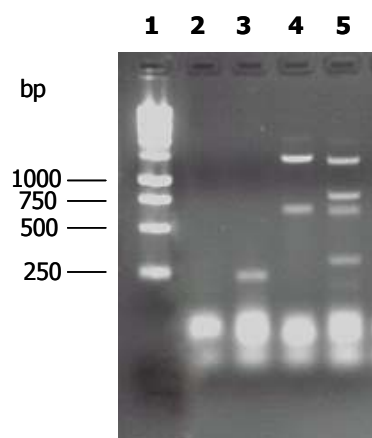
**Passo 5** – Hibridação e extensão a 67°C, durante 3 minutos.

(Os passos 4 e 5 foram repetidos 32 vezes)

**Passo 6** – Amplificação final a 67°C, durante 7 minutos.

**Passo 7** – Permanência a 4°C em pausa.

O resultado da reacção de PCR foi verificado através de uma electroforese em gel de agarose 1.5%, cuja fotografia se encontra na figura II.4.9.



**Figura II.4.9.** Gel de 1.5% de agarose da primeira reacção de PCR da técnica de “*Genome Walking*” no sentido do C-terminal da NORB. **Poços:** 1. Marcador de pesos moleculares 1kB (*Promega*); 2 a 5. Reacções de PCR usando como ADN molde as livrarias genómicas das enzimas *DraI*, *EcoRV*, *PvuII* e *StuI*, respectivamente.

### 2.1.3.3. Segunda Reacção de PCR

Na segunda reacção de PCR usou-se como ADN molde uma diluição de 1:50 do resultado da primeira reacção. Usaram-se os iniciadores NO10 e AP2.

O programa de PCR usado encontra-se descrito abaixo:

<sup>4</sup> Tendo em conta a  $T_m$  do NO9=69.5°C seguiu-se a regra geral para as temperaturas de emparelhamento.

**Passo 1** – Desnaturação inicial da cadeia de ADN a 94°C, durante 25 segundos.

**Passo 2** – Desnaturação a 94°C, durante 25 segundos.

**Passo 3** – Hibridação e extensão a 72°C<sup>5</sup>, durante 3 minutos.

(Os passos 2 e 3 foram repetidos 5 vezes)

**Passo 4** – Desnaturação a 94°C, durante 25 segundos.

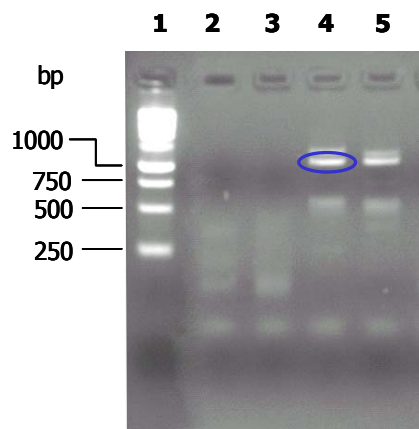
**Passo 5** – Hibridação e extensão a 67°C, durante 3 minutos.

(Os passos 4 e 5 foram repetidos 24 vezes)

**Passo 6** – Amplificação final a 67°C, durante 7 minutos.

**Passo 7** – Permanência a 4°C em pausa.

O resultado da reacção de PCR foi verificado através de uma electroforese em gel de agarose 1.5%, cuja fotografia se encontra na figura II.4.10.



**Figura II.4.10.** Gel de 1.5% de agarose da segunda reacção de PCR da técnica de “*Genome Walking*” no sentido do C-terminal da NORB. **Poços:** 1. Marcador de pesos moleculares 1kB (*Promega*); 2 a 5: reacções de PCR usando como ADN molde as primeiras reacções com as livrarias genómicas da enzima *DraI* (2), *EcoRV* (3), *PvuII* (4), *StuI* (5).

<sup>5</sup> Tendo em conta a  $T_m$  do NO10=70.3°C seguiu-se a regra geral para as temperaturas de emparelhamento..

### 2.1.3.4. Sequência Obtida

Após obtenção do produto amplificado por “*Genome Walking*” a partir do gel de agarose, seguiu-se o procedimento descrito anteriormente. A sequência determinada para o fragmento de ADN correspondente ao C-terminal da NORB de *Ps. nautica* encontra-se na figura II.4.11.

tatggcgcctacgtaatgattgtactga	ccatcatttcctacgccatgccaatcatgcgc
Y G A Y V M I V L	T I I S Y A M P I M R
ggtcgcccctacggcaacagcaataccgctcagattgtggaaatgtggggcttctggctg	
G R P Y G N S N T A Q I V E M W G F W L	
atgaccatctccatgggtgttcacaccctgttcctgaccgctgccggcgctcctgcagggt	
M T I S M V F I T L F L T A A G V L Q V	
tggctgcagcgtattccggaaagcgggtgaagcgcgtgtccttcattggcaggccaggatcag	
W L Q R I P E S G E A L S F M A G Q D Q	
atcgccctgttctactggatgcgatttgcgcgggtgccttcttcattggccggcctgggtg	
I A L F Y W M R F V A G A F F M A G L V	
gtgtacttcggtagcttctttatcaaggcggaagcgagcccggtgaggaagtccggggg	
V Y F G S F F I K G E A S P A E E V R G	
cctgccacggcagacgcctga	
P A T A D A -	

**Figura II.4.11.** Fragmento da sequência de ADN da NORB de *Ps. nautica* com a respectiva sequência de aminoácidos por ela codificada, obtido através da técnica de “*Genome Walking*” no sentido do C-terminal. A sequência do iniciador NO10 encontra-se evidenciada através de uma caixa. Na sequência de aminoácidos (-) significa o codão de terminação.

### 2.1.4. Sequenciação da NORC

Como foi referido no Capítulo 1, Parte II, o gene *norC* situa-se a montante do gene *norB*, pelo que o fragmento obtido na segunda reacção de PCR do “*Genome Walking*” no sentido N-terminal de NORB continha também alguma da sequência da NORC. Esta é apresentada na figura II.4.12.

A NORC é uma proteína com cerca de 146 aminoácidos. Após a obtenção deste fragmento de 100 aminoácidos apenas ficou a faltar cerca de 32% da sua sequência. Para a determinação desta, seguiu-se a abordagem anterior de proceder à técnica de “*Genome Walking*” no sentido N-terminal da NORC.

```

gtggtgcgcggaacacatctgtggaagagaacaactgtgtcggttgatccatcatg
V V R G K H L W E E N N C V G C H S I M
ggcgaaggcgcttacttcgctcccgaactggccaacgtgtttgaccgccgtggcgcggt
G E G A Y F A P E L A N V F D R R G G G
gatactgaggtcttcaaggcatacatgaaagcctggatgaacgccatgccacgaatatt
D T E V F K A Y M K A W M N A M P T N I
ccgggccggcgccagatgccggatttcaatctgagtgttccgaggtcgaagacctggcc
P G R R Q M P D F N L S D S E V E D L A
gctttcctggagtgacatccaagatcgacgacaacggttgccacccaacatcgagggg
A F L E W T S K I D D N G W P P N I E G
taa
-

```

**Figura II.4.12.** Fragmento da sequência de ADN da NORC de *Ps. nautica* com a respectiva sequência de aminoácidos por ela codificada, obtido através da técnica de “Genome Walking” no sentido do N-terminal da NORB, com o iniciador NO5.

Desenharam-se dois iniciadores na cadeia complementar à codificante:

$\overleftarrow{\text{NO7}}$  5'- gcgcttcgcccatgatggaatgacaa -3'  
 $\overleftarrow{\text{NO8}}$  5'- agttgttctcttcccacagatgtttgc -3'

em que os iniciadores sintetizados são complementares e inverso da sequência de ADN que codifica para a proteína.

Na figura II.4.13 é possível observar a localização destes dois iniciadores na sequência de ADN conhecida.

```

                                ← NO8                                ← NO7
gtggtgcgcggaacacatctgtggaagagaacaactgtgtcggttgatccatcatg
V V R G K H L W E E N N C V G C H S I M
ggcgaaggcgcttacttcgctcccgaactggccaacgtgtttgaccgccgtggcgcggt
G E G A Y F A P E L A N V F D R R G G G
gatactgaggtcttcaaggcatacatgaaagcctggatgaacgccatgccacgaatatt
D T E V F K A Y M K A W M N A M P T N I
ccgggccggcgccagatgccggatttcaatctgagtgttccgaggtcgaagacctggcc
P G R R Q M P D F N L S D S E V E D L A
gctttcctggagtgacatccaagatcgacgacaacggttgccacccaacatcgagggg
A F L E W T S K I D D N G W P P N I E G
taa
-

```

**Figura II.4.13.** Localização na sequência de ADN da NORC de *Ps. nautica*, dos iniciadores NO7 e NO8 para a primeira e segunda reacção de PCR no sentido do N-terminal.

#### 2.1.4.1. Primeira Reacção de PCR

Utilizaram-se as bibliotecas genómicas anteriormente construídas para a realização da primeira reacção de PCR com os iniciadores NO7 e AP1.

O programa de PCR usado foi o seguinte:

**Passo 1** – Desnaturação inicial da cadeia de ADN a 94°C, durante 25 segundos.

**Passo 2** – Desnaturação a 94°C, durante 25 segundos.

**Passo 3** – Hibridação e extensão a 78°C<sup>6</sup>, durante 3 minutos.

(Os passos 2 e 3 foram repetidos 7 vezes)

**Passo 4** – Desnaturação a 94°C, durante 25 segundos.

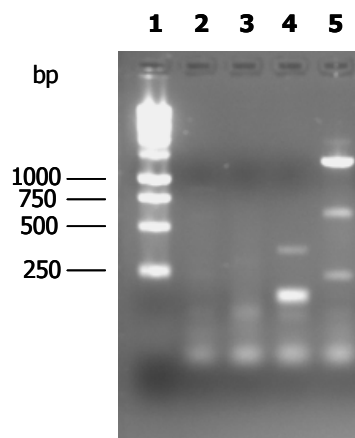
**Passo 5** – Hibridação e extensão a 72°C, durante 3 minutos.

(Os passos 4 e 5 foram repetidos 32 vezes)

**Passo 6** – Amplificação final a 67°C, durante 7 minutos.

**Passo 7** – Permanência a 4°C em pausa.

O resultado da reacção de PCR foi verificado através de uma electroforese em gel de agarose 1.5%, cuja fotografia se encontra na figura II.4.14.



**Figura II.4.14.** Gel de 1.5% de agarose da primeira reacção de PCR da técnica de “*Genome Walking*” no sentido do N-terminal da NORC. **Poços:** 1. Marcador de pesos moleculares 1kB (*Promega*); 2 a 5. Reacções de PCR usando como ADN molde as livrarias genómicas das enzimas *DraI*, *EcoRV*, *PvuII* e *StuI*, respectivamente.

<sup>6</sup> Tendo em conta a  $T_m$  do NO7=81.3°C usou-se uma temperatura de emparelhamento para os primeiros ciclos de 78°C, visto que já se havia verificado não ser aconselhável ultrapassar aquela temperatura.

### 2.1.4.2. Segunda Reacção de PCR

Na segunda reacção de PCR usou-se como ADN molde uma diluição de 1:50 do resultado da primeira reacção. Usaram-se os iniciadores NO8 e AP2.

O programa de PCR usado encontra-se descrito abaixo:

**Passo 1** – Desnaturação inicial da cadeia de ADN a 94°C, durante 25 segundos.

**Passo 2** – Desnaturação a 94°C, durante 25 segundos.

**Passo 3** – Hibridação e extensão a 72°C<sup>7</sup>, durante 3 minutos.

(Os passos 2 e 3 foram repetidos 5 vezes)

**Passo 4** – Desnaturação a 94°C, durante 25 segundos.

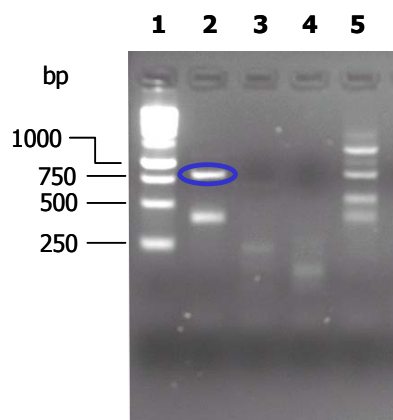
**Passo 5** – Hibridação e extensão a 67°C, durante 3 minutos.

(Os passos 4 e 5 foram repetidos 24 vezes)

**Passo 6** – Amplificação final a 67°C, durante 7 minutos.

**Passo 7** – Permanência a 4°C em pausa.

O resultado da reacção de PCR foi verificado através de uma electroforese em gel de agarose 1.5%, cuja fotografia se encontra na figura II.4.15.



**Figura II.4.15.** Gel de 1.5% de agarose da segunda reacção de PCR da técnica de “Genome Walking” no sentido do N-terminal da NORC. **Poços:** **1.** Marcador de pesos moleculares 1kB (*Promega*); **2 a 5:** reacções de PCR usando como ADN molde as primeiras reacções com as livrarias genómicas da enzima *DraI* (**2**), *EcoRV* (**3**), *PvuII* (**4**), *StuI* (**5**).

<sup>7</sup> Tendo em conta a  $T_m$  do NO8=69.8°C seguiu-se a regra geral para as temperaturas de emparelhamento.

### 2.1.3.4. Sequência Obtida

Após obtenção do produto amplificado por “*Genome Walking*” a partir do gel de agarose, seguiu-se o procedimento descrito anteriormente. A sequência determinada para o fragmento de ADN correspondente ao N-terminal da NORC de *Ps. nautica* encontra-se na figura II.4.16.

```

atggccgagcgctttaccaaaagcatggccaggaacatatatctggggggaagtgccttc
M A E R F T K S M A R N I Y L G G S A F
ttcgtcctgctgttccctggccctgacttttgacactcagctgctgctatgcccgagcgg
F V L L F L A L T F D T Q L R A M P E R
gataaccgacgagctcaccgaacaggtggtgcgcggaacatctgtgggaagagaac
D N R D E L T E Q V V R G K H L W E E N
aac
N
    
```

**Figura II.4.16.** Fragmento da sequência de ADN da NORC de *Ps. nautica* com a respectiva sequência de aminoácidos por ela codificada, obtido através da técnica de “*Genome Walking*” no sentido do N-terminal. A sequência do iniciador NO8 encontra-se evidenciada através de uma caixa.

## 3. Sequência da Redutase do Óxido Nítrico de *Pseudomonas nautica*

Através da técnica de “*Gemone Walking*” em ambos os sentidos em relação à sequência de ADN inicialmente conhecida conseguiu-se obter a totalidade das sequências de ADN dos genes *norB* e *norC* de *Ps. nautica*. A sequência da NORB é apresentada na figura II.4.17 e a da NORC na figura II.4.18.

Na figura II.4.19 compara-se a sequência da NORC de *Ps. nautica* com a das outras NORC's conhecidas, e na figura II.4.20 procede-se à mesma comparação para a NORB. Através dessa comparação pode verifica-se a grande homologia entre a NOR de *Ps. nautica* e as restantes cNOR's.

```

atgaaatacgaatctcaaagggtcgccatgccctacttcatctttgccctgattctgttt
M K Y E S Q R V A M P Y F I F A L I L F
gccggccagattgtgttcggcctgattctgggtctccagtaagttgtcggtgatttcctg
A G Q I V F G L I L G L Q Y V V G D F L
tttccggaaattcctttcaacgttgcgcggatggtgcataccaacctgctgattgtctgg
F P E I P F N V A R M V H T N L L I V W
ctgctgttcggcttcatggcgccacctaactacatggttccggaagaagcccagaccgaa
L L F G F M G A T Y Y M V P E E A Q T E
ctgcacagccccctgctggcgtggattctgttctgggtgttcgcggcagctggcacgctg
L H S P L L A W I L F W V F A A A G T L
accatcctgggttacctgtttgtggactacgccaccttggcagaagtcaccatgaacaag
T I L G Y L F V D Y A T L A E V T M N K
ttgctacccacatgggcccggagttcctggagcaacccacgataaccaagatcggtatc
L L P T M G R E F L E Q P T I T K I G I
gccgtggtcgtgggtggcgttctctataacatcgccatgaccgcgctgaaagccgcaag
A V V V V A F L Y N I A M T A L K G R K
accgtggtcaacatcgtactgatcaccggcctggtaggcctggcgtattgtggctgttc
T V V N I V L I T G L V G L A V L W L F
tccttctacaacccccggcaacctggccaccgacaagtaacttctgggtggtttgtggccac
S F Y N P G N L A T D K Y F W W F V V H
ctgtgggtagaaggcgtgtgtggaactgatcatgggtgccattctggcctatgtgttgatc
L W V E G V W E L I M G A I L A Y V L I
aagctcacaggtgttagaccggaagtaatcgagaagtggctgtacgtgatcatcgccatg
K L T G V D R E V I E K W L Y V I I A M
gcgctgattaccggcatcatcggtaccgggcaccacttcttctggatcgggccgcccag
A L I T G I I G T G H H F F W I G P P E
tactggctctggctgggttctgtgttctctgcactggaaccgcttccgttcttcatgatg
Y W L W L G S V F S A L E P L P F F M M
gtggtcttcgccttcaacatgatcaaccgtcgccgcccgaaccacccgaacaaggccg
V V F A F N M I N R R R R N H P N K A A
atgctgtgggcatgggtacaaccgtcatggcattcctgggcgctggcgtgtggggcttc
M L W A M G T T V M A F L G A G V W G F
ctgcacaccctgggtccggtgaactgggtacacccatggtagccagattaccgcagcccac
L H T L A P V N W Y T H G S Q I T A A H
ggccacatggccttctatggcgccctacgtaatgattgtactgaccatcatttctacgcc
G H M A F Y G A Y V M I V L T I I S Y A
atgccaatcatgcgcggtcgccctacggcaacagcaataaccgctcagattgtggaaatg
M P I M R G R P Y G N S N T A Q I V E M
tggggcttctggctcatgaccatctccatgggtgttcatcacctgttctgaccgctgcc
W G F W L M T I S M V F I T L F L T A A
ggcgtcctgcagggttgggtgcagcgatttccggaaagcgggtgaagcgctgtccttcatg
G V L Q V W L Q R I P E S G E A L S F M
gcaggccaggatcagatcgccctgttctactggatgcgatttgcgccggtgccttcttc
A G Q D Q I A L F Y W M R F V A G A F F
atggccggcctggtggtgtacttcggttagcttctttatcaaggcggaagcgagcccggct
M A G L V V Y F G S F F I K G E A S P A
gaggaagtccggggcctgccacggcagacgcctga
E E V R G P A T A D A -

```

**Figura II.4.17.** Sequência total de ADN da NORB de *Ps. nautica* com os respectivos aminoácidos codificados por baixo de cada codão.



atggccgagcgctttaccaaagcatggccaggaacatatctggggggaagtgccttc  
 M A E R F T K S M A R N I Y L G S A F  
 ttcgctcctgctgttcctggccctgacttttgacactcagctgctgctatgcccagcg  
 F V L L F L A L T F D T Q L R A M P E R  
 gataaaccgagcgagctcaccgaacaggtggtgcgcggaacacatctgtgggaagagaac  
 D N R D E L T E Q V V R G K H L W E E N  
 aactgtgtcggttgtcattccatcagggcggaaggcgttacttcgctcccgaactggcc  
 N C V G C H S I R G E G A Y F A P E L A  
 aacgtgtttgaccgcccgtggcgggcggtgatactgaggtcttcaaggcatacatgaaagcc  
 N V F D R R G G G D T E V F K A Y M K A  
 tggatgaacgccatgccacgaatattccggggcgccagatgccggatttcaatctg  
 W M N A M P T N I P G R R Q M P D F N L  
 agtgattccgaggtcgaagacctggccgctttcctggagtggacatccaagatcgacgac  
 S D S E V E D L A A F L E W T S K I D D  
 aacggttggccaccaacatcgaggggtaa  
 N G W P P N I E G -

**Figura II.4.18.** Sequência total de ADN da NORC de *Ps. nautica* com os respectivos aminoácidos codificados por baixo de cada codão.

	1	10	20	30	40	50	60	70
<i>Ps. nautica</i>	M A E R F T K S M A R N I Y L G S A F F V L L F L A L T F D T Q L R A M P E R D N R D E L T E Q V V R G K H L W E E N C V G C H S I R G							
<i>Ps. aeruginosa</i>	M S E T F T K C M A R N I Y F G C S V F F I L L F L A L T Y H T E K . T L P E R T N E A A M S A A V V R C K L V W E S N N C V G C H T L L G							
<i>Ps. stutzeri</i>	M S E T F T K C M A R N I Y F G C S V F F I L L F L A L T Y H T E Q . T F P E R T N E S E M T E A V V R C K E V W E S N N C I G C H S L L G							
<i>Pa. denitrificans</i>	M S E I M T K N M A R N V F Y G C S I F F I L L F G A L T V H S H I Y A R T K A V D E S Q L T E S V V R C K H I W E R N A C I D C H T L L G							
<i>Pa. halodenitrificans</i>	M A I G L T K S A A R N I F Y G C S L F F F L L F A L T A H S H W Y M V N K S T L N E G L T E S V V R C K H I W E R N M C I N C H S I M G							

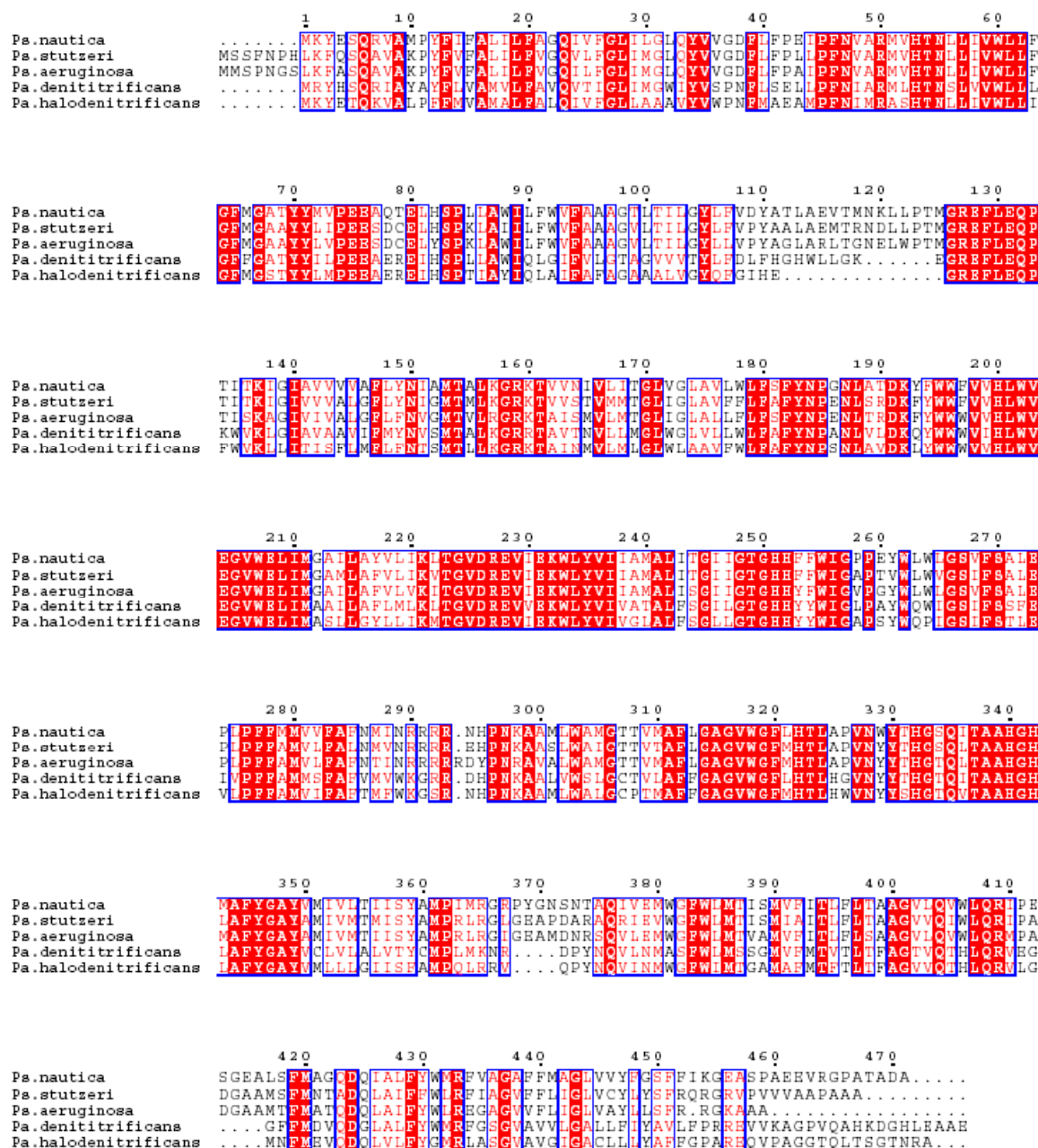
  

	80	90	100	110	120	130
<i>Ps. nautica</i>	E G A Y F A P E L A N V F D R R C G G . D T V F K A Y T K A W M N A M P T N I P G R R O M P E N L S D S E V E D L A A F L E W T S K I D D					
<i>Ps. aeruginosa</i>	E G A Y F A P E L C N V V G R R C S . . E E G F N T F Q A W M N I Q P L N V F G R R A M P G E H L S E G Q V D D L A E F L K W S S K I D					
<i>Ps. stutzeri</i>	E G A Y F A P E L C N V V R R R C S . . E E T F K P F L A W M K A Q P L G A F G R R A M P G E N L S E Q Q V D D M A E F L K W T S K I D					
<i>Pa. denitrificans</i>	E G A Y F A P E L C N V M K R W C V Q D D P S A F E T L K G W M E S M P T I G E E G R R Q M P R E D L T D E E F R A L S D F L W T G T I N					
<i>Pa. halodenitrificans</i>	E G A Y F A P E L S N V W E R Y C G H Q N P E A A R A G L A A W I R A Q P L G C G R R O M P A N D F E D E M S S L I D F L E W T D G I D					

	140
<i>Ps. nautica</i>	D N G W P P N I E G
<i>Ps. aeruginosa</i>	T N Q W P P N K E G
<i>Ps. stutzeri</i>	T N D W P P N K E G
<i>Pa. denitrificans</i>	T C N W P P N D A G
<i>Pa. halodenitrificans</i>	D C D W P P H P A G

**Figura II.4.19.** Comparação das sequências de aminoácidos das NORC de *Ps. nautica*, *Ps. aeruginosa* [1], *Ps. stutzeri* [2], *Pa. denitrificans* [3] e *Pa. halodenitrificans* [4].



**Figura II.4.20.** Comparação das sequências de aminoácidos das NORB de *Ps. nautica*, *Ps. stutzeri* [2], *Ps. aeruginosa* [1], *Pa. denitrificans* [3] e *Pa. halodenitrificans* [4].

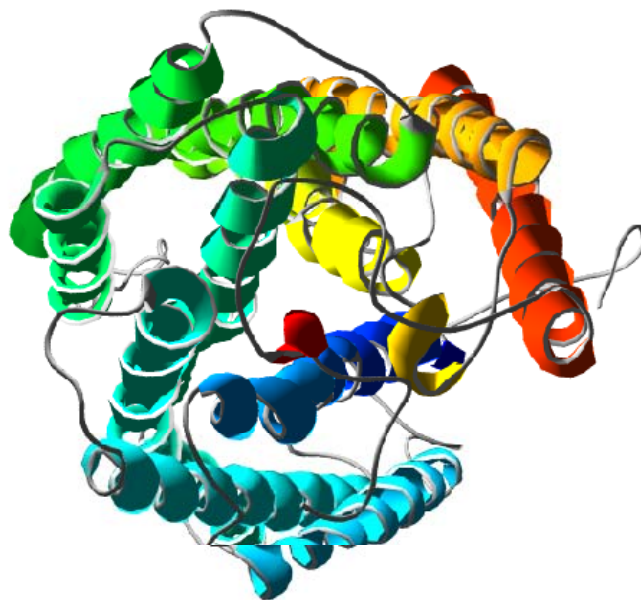
A comparação das sequências da figura II.4.20 permite-nos verificar quais são as histidinas conservadas que se supõe serem ligandos dos hemos e do ferro não hémico e bem como os resíduos de ácido glutâmico conservados. Na NOR de *Ps. nautica*, as histidinas 53 e 342, deverão ocupar a posição de coordenação axial do hemo *b* em configuração de spin

baixo, enquanto que a histidina 340, é o deverá ser o ligando do hemo  $b_3$  no estado reduzido. O  $\text{Fe}_B$  deverá ter como ligandos as histidinas 200, 251 e 252. Existem diversos resíduos de ácido glutâmico conservados nas NOR's que não o são nas oxidases terminais HCO. Para dois destes resíduos, E 131 e E 204 (em *Ps. stutzeri*), foi verificado por mutagénese na NOR de *Pa. denitrificans* a sua importância fundamental na catálise. Foi proposto que estes participassem na recepção de prótons ou na química do NO no sítio activo da enzima, no entanto o seu papel é ainda incerto [5].

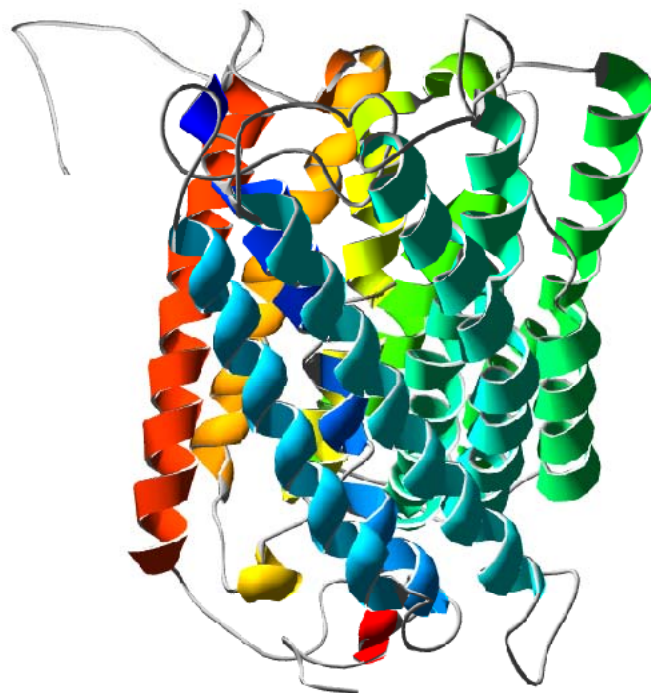
A partir das sequências de aminoácidos das duas subunidades na NOR de *Ps. nautica*, pode-se calcular a sua massa molecular. O valor obtido para a massa molecular da NORC de 17 589.63 Da, tendo em conta a existência de um hemo do tipo  $c$ , é bastante semelhante ao resultado da espectrometria de massa, 17 430 Da, apresentado no Capítulo 3. O valor obtido para a massa molecular apoproteína da NORB foi de 53 096 Da, e 54 381 Da assumindo a presença de dois hemos  $b$  e de um ferro não hémico. A massa molecular da NOR com uma constituição  $\alpha\beta$  é de 71 811 Da.

#### **4. Modelo da Estrutura Tridimensional da NORB de *Ps. nautica***

Após determinação da sequência de aminoácidos na NORB de *Ps. nautica* e tendo em conta a semelhança do modelo topológico proposto para a NORB de *Ps. stutzeri* com as oxidases do citocromo  $c$  da família das oxidases hemo-cobre, foi possível usar as estruturas tridimensionais obtidas por Cristalografia de Raios-X de duas destas oxidases, a de *R. sphaeroides* e a de *Pa. denitrificans* para produção de um modelo da estrutura da subunidade NORB de *Ps. nautica*. O modelo foi realizado no programa Swiss-PdbViewer. As estruturas das duas oxidases foram usadas como modelo ao qual se ajustou a sequência de aminoácidos da subunidade NORB. O alinhamento foi optimizado para corrigir os erros introduzidos pelo programa e o projecto foi submetido ao SWISS-MODEL [6-8] para construção do modelo. O resultado obtido foi ainda optimizado em termos de energia e de cadeias laterais que se encontravam sobrepostas. O resultado é apresentado nas figuras II.4.21 (vista de topo) e II.4.22 (vista de lado).



**Figura II.4.21.** Modelo da estrutura tridimensional da subunidade NORB de *Ps. nautica*, obtido do programa SWISS-MODEL [6-8]. Vista de topo.



**Figura II.4.21.** Modelo da estrutura tridimensional da subunidade NORB de *Ps. nautica*, obtido do programa SWISS-MODEL [6-8]. Vista de lado.

Tendo em conta a homologia de apenas 10% entre as oxidases do citocromo *c* que serviram de modelo e a NORB de *Ps. nautica*, o modelo aqui apresentado é apenas um “rascunho” do que será a estrutura tridimensional desta subunidade da proteína, este serve o intuito de observar as zonas de estrutura secundária em hélice- $\alpha$  transmembranares (tal como no modelo da NORB de *Ps. stutzeri*). Nas figuras II.4.21 e II.4.22 apenas se apresenta a cadeia principal da proteína, visto que será nas cadeias laterais que o modelo deverá apresentar mais falhas.

## 5. Bibliografia

1. **Arai, H., Igarashi, Y. e Kodama, T.** (1995) "The structural genes for nitric oxide reductase from *Pseudomonas aeruginosa*." *Biochim Biophys Acta* **1261**, 279-284
2. **Zumft, W. G., Braun, C. e Cuypers, H.** (1994) "Nitric oxide reductase from *Pseudomonas stutzeri*. Primary structure and gene organization of a novel bacterial cytochrome *bc* complex." *Eur J Biochem* **219**, 481-490
3. **Mukai, K., Miyake, K., Andoh, J. e Iijima, S.** (1998) "Cloning and nucleotide sequence of the nitric oxide reductase locus in *Paracoccus denitrificans* IFO 12442." DDBJ/EMBL/GenBank databases
4. **Sakurai, N. e Sakurai, T.** (1998) "Genomic DNA cloning of the region encoding nitric oxide reductase in *Paracoccus halodenitrificans* and a structure model relevant to cytochrome oxidase." *Biochem Biophys Res Commun* **243**, 400-406
5. **Butland, G., Spiro, S., Watmough, N. J. e Richardson, D. J.** (2001) "Two conserved glutamates in the bacterial nitric oxide reductase are essential for activity but not assembly of the enzyme." *J Bacteriol* **183**, 189-199
6. **Guex, N. e Peitsch, M.** (1997) "SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modelling." *Electrophoresis* **18**, 2714-2723
7. **Peitsch, M.** (1995) "Protein modeling by E-mail." *Bio/Technology* **13**, 658-660
8. **Schwede, T., Kopp, J., Guex, N. e Peitsch, M.** (2003) "SWISS-MODEL: an automated protein homology-modeling server." *Nucleic Acids Research* **31**, 3381-3385

## *CAPÍTULO 5*

---

---

### Discussão e Conclusões

---

---

Capítulo 5 - Discussão e Conclusões

1. Integração do Resultados e Perspectivas Futuras .....	223
2. Bibliografia .....	225



## 1. Integração do Resultados e Perspectivas Futuras

A redutase do óxido nítrico isolada a partir da bactéria *Pseudomonas nautica* pertence à classe das cNOR's. Os resultados dos presentes estudos confirmam a estequiometria dos cofactores anteriormente sugerida para as restantes três cNOR's isoladas até à data de 1 hemo *c* : 2 hemos *b* : 1 Ferro não hémico. Um dos hemos *b* e o hemo *c* apresentam uma configuração de spin baixo. No entanto, a presença de um hemo *b* em configuração de spin alto apenas pôde ser inferida através de um conjunto de sinais, pouco representativos em termos do número de spins totais, no espectro de RPE da NOR no seu estado nativo. No espectro de UV/visível do estado nativo da NOR de *Ps. nautica* a banda de fraca intensidade a 595 nm, que foi tomada como sendo indicativa da presença de um hemo *b* em configuração de spin alto nas restantes NOR's, não foi observada, mesmo quando se oxidou a amostra com ferricianeto.

O modelo catalítico proposto por Moënne-Loccoz [1, 2] em que no estado oxidado os dois átomos de ferro do centro catalítico se encontram acoplados através de uma ponte  $\mu$ -oxo explica o facto de ambos não serem observados através de espectroscopia de RPE. No entanto a repetida quebra e formação de uma ligação covalente entre a histidina e o hemo *b*<sub>3</sub> ao longo do ciclo catalítico parece pouco provável. De acordo com o espectro de RPE da NOR reduzida com ascorbato de sódio e DAD esta parece ser a forma reduzida em três electrões que se pensa ser a forma activa da enzima [3]. No entanto, o facto de não se observar um aumento da intensidade dos sinais a campo baixo correspondentes ao sistema de spin alto, parece indicar que alguma parte do hemo *b*<sub>3</sub> se encontra reduzida ou que não houve quebra de acoplamento como seria de esperar através do modelo.

Estudos recentes em que se pensa ter quebrado a ponte  $\mu$ -oxo da forma oxidada da NOR de *Pa. denitrificans* por diminuição do pH, permitiram verificar um aumento, no espectro de RPE do sinal do sistema de spin alto, sem que houvesse um correspondente aparecimento de um sinal correspondente ao ferro não hémico. Estes resultados não são explicados pelo modelo vigente. Vários estudos deverão ainda ser conduzidos para que se possa compreender melhor o mecanismo catalítico e a estrutura do centro activo das redutases do óxido nítrico.

Os resultados dos estudos através de espectroscopia de RPE da NOR incubada com o seu substrato permitem verificar a existência de uma espécie hémica pentacoordenada ligada a NO e outra hexacoordenada. Embora estas possam corresponder a um estado inactivo da

enzima, podem também indicar que o modelo para o mecanismo catalítico em que a ligação do hemo à histidina é quebrada com a ligação de uma molécula de NO na outra posição de coordenação axial do hemo poderá não ser correcto. O aparecimento de um sinal de Ferro não hémico ligado ao NO apenas na preparação em que a enzima foi incubada com excesso de NO a partir de uma mistura gasosa pode significar que apenas neste caso se estaria perante uma forma inactiva da enzima podendo as restantes amostras (em que se produziu NO *in situ*) corresponder a um intermediário do ciclo catalítico.

No entanto, os dados disponíveis até ao momento não nos permitem mais do que especular. Será importante prosseguir os estudos de RPE recorrendo à técnica de “*rapid freeze quench*” com o intuito de estudar os intermediários da reacção. Para verificação do modelo de mecanismo catalítico proposto e configuração do centro activo nos estados oxidado e reduzido da enzima, será essencial recorrer à técnica de Mössbauer que permite, ao contrário da espectroscopia de RPE observar os sinais correspondentes a todos os átomos de ferro presentes na amostra, independentemente do seu estado de spin. A determinação da estrutura tridimensional por Cristalografia de Raios-X será de importância fundamental na confirmação do modelo topológico até à data proposto para a enzima e verificação da configuração do centro activo.

## 2. Bibliografia

1. **Moenne-Loccoz, P. e de Vries, S.** (1998) "Structural characterization of the catalytic high-spin heme *b* of nitric oxide reductase: a resonance Raman study." *J Am Chem Soc* **120**, 5147-5152
2. **Moenne-Loccoz, P., Richter, O. M. H., Huang, H., Wasser, I. M., Ghiladi, R. A., Karlin, K. D. e de Vries, S.** (2000) "Nitric oxide reductase from *Paracoccus denitrificans* contains an oxo-bridged heme/non-heme diiron center." *J Am Chem Soc* **122**, 9344-9345
3. **Gronberg, K. L., Watmough, N. J., Thomson, A. J., Richardson, D. J. e Field, S. J.** (2004) "Redox-dependent Open and Closed Forms of the Active Site of the Bacterial Respiratory Nitric-oxide Reductase Revealed by Cyanide Binding Studies." *J Biol Chem* **279**, 17120-17125



---

---

## APÊNDICES

---

---

Apêndice A - Meios de Cultura e Condições de Crescimento.....	229
Apêndice B - Materiais e Métodos Gerais .....	237
Apêndice C - Protocolos de Biologia Molecular .....	259
Apêndice D - Ensaios de Actividade.....	271

## *APÊNDICE A*

---

---

### Meios de Cultura e Condições de Crescimento

---

---

Apêndice A – Meios de Cultura e Condições de Crescimento

A.1. Crescimentos da Bactéria <i>Pseudomonas stutzeri</i> ATCC 11607 .....	231
A.1.1. Meio de Cultura para <i>Ps. stutzeri</i> ATCC 11607 .....	231
A.1.2. Crescimentos em Balão Erlenmeyer .....	232
A.1.3. Condições de Crescimento em Fermentador.....	233
A.2. Crescimento da Bactéria <i>Pseudomonas náutica</i> 617 e Obtenção das Membranas Celulares.....	234
A.3. Bibliografia .....	236



## A.1. Crescimentos da Bactéria *Pseudomonas stutzeri* ATCC 11607

### A.1.1. Meio de Cultura para *Ps. stutzeri* ATCC 11607

O meio otimizado para os crescimentos de *Ps. stutzeri* apresenta a composição indicada na tabela A.1.

**Tabela A.1.** Composição do meio de cultura para o crescimento da bactéria *Ps. stutzeri* ATCC 11607

Reagente	Quantidade para 1 litro de meio
NaCl	5 g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	12.3 g
KCl	0.75 g
Tris	6.05 g
NH <sub>4</sub> Cl	1 g
CaCl <sub>2</sub>	1.49 g
Extracto de Levedura	1 g
Citrato	15 g

Prepara-se o meio, acerta-se o valor de pH para 7 e autoclava-se. As soluções da tabela A.2. são preparadas e autoclavadas separadamente, só então sendo adicionadas ao meio de cultura, de acordo com as quantidades indicadas na tabela A.2. A composição da solução de oligoelementos encontra-se na tabela A.3.

**Tabela A.2.** Soluções para suplementar o meio de cultura para o crescimento de *Ps. stutzeri*

Solução	Para 1 litro de meio de cultura
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O (1 mg /ml) <sup>1</sup>	1 ml
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·3H <sub>2</sub> O (1.86 % (p/v))	2 ml
Oligoelementos (tabela A.3)	0.2 ml

<sup>1</sup> Adicionar 2 a 3 gotas de ácido sulfúrico a esta solução.

**Tabela A.3.** Composição da solução de oligoelementos (Solução de Starkey)[1]

Reagente	Quantidade para 1 litro de solução
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	6.2 g
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1.44 g
MgSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	1.12 g
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.25 g
CoSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.9 g
BO <sub>3</sub> H <sub>3</sub>	0.06 g
Mo <sub>7</sub> (NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> O <sub>24</sub> ·4H <sub>2</sub> O	1 g
Ni(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.04 g
Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub>	0.02 g
HCl concentrado	51.4 ml

### A.1.2. Crescimentos em Balão Erlenmeyer

Os crescimentos em balão Erlenmeyer tiveram o objectivo de escolher a melhor fonte de carbono e energia para o crescimento de *Ps. stutzeri*. Assim, utilizou-se o meio mineral da tabela A.1, substituindo apenas o citrato por outras fontes de carbono com diferentes concentrações. As densidades ópticas medidas a 625 nm para cada balão são apresentadas nas tabelas A.4, A.5 e A.6

**Tabela A.4.** Densidades ópticas medidas ao longo do tempo para os balões A a H.

Balão	A	B	C	D	E	F	G	H
Ferro	+	+			+	+		
[Citrato] (g/l)	5	5	5	5	13	13	13	13
Tempo (h)	DO 625 nm							
0	0.02	0.02	0.02	0.02	0.01	0.02	0.02	0.02
3	0.08	0.06	0.06	0.05	0.06	0.06	0.06	0.06
19.8	1.38	1.41	1.51	1.42	1.78	1.98	1.94	1.77
23.6	1.26	1.39	1.36	1.34	1.96	2.16	2.05	1.97
25.8	1.33	1.34	1.34	1.38	2.32	2.18	2.04	2.07

Tabela A.5. Densidades ópticas medidas ao longo do tempo para os balões I a P.

Balão	I	J	K	L	M	N	O	P
Ferro	+	+			+	+		
[Lactato] (g/l)	5	5	5	5	13	13	13	13
Tempo (h)	DO 625 nm							
0.0	0.01	0.02	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
2.7	0.02	0.02	0.04	0.03	0.01	0.01	0.01	0.01
4.6	0.03	0.02	0.10	0.10	0.01	0.01	0.01	0.01
6.3	0.05	0.03	0.27	0.25	0.01	0.02	0.01	0.02
7.8	0.07	0.06	0.56	0.54	0.01	0.01	0.01	0.01
24.0	1.95	1.97	2.03	2.20	0.01	0.01	0.01	0.01
25.5	1.98	1.99	2.06	2.25	0.01	0.01	0.01	0.01

Tabela A.6. Densidades ópticas medidas ao longo do tempo para os balões Q a Z.

Balão	A	B	C	D	E	F	G	H
Ferro	+	+						
Nutriente	Citrato	Citrato	Citrato	Citrato	Dextrose	Dextrose	Acetato	Acetato
Concentração (g/l)	15	15	15	15	10	10	10	10
Tempo (h)	DO 625 nm							
0	0.02	0.02	0.02	0.02	0.01	0.01	0.01	0.01
2	0.02	0.02	0.03	0.02	0.03	0.03	0.01	0.01
4	0.05	0.06	0.09	0.04	0.07	0.07	0.02	0.02
6	0.10	0.12	0.12	0.08	0.15	0.15	0.01	0.01
8	0.21	0.34	0.29	0.20	0.34	0.36	0.01	0.01
24.8	2.00	2.25	2.37	2.02	1.50	1.37	0.01	0.01
26.1	2.13	2.30	2.48	2.07	1.57	1.45	0.01	0.01

### A.1.3. Condições de Crescimento em Fermentador

A bactéria *Ps. stutzeri* ATCC 11607 foi crescida a 30°C durante cerca de 22 horas e meia, num reactor Biolafitte (*Poissy, França*) com um volume total de 50 litros e um volume de trabalho de 30 litros de meio de cultura. A taxa de arejamento foi de 0.2 vvm (volume de ar por volume de meio, por minuto) e a velocidade de agitação 150 rpm (utilizando turbinas de Rushton). Para monitorizar o pH usou-se um eléctrodo de pH Mettler Toledo (*Greifensee*) e

para medir o oxigénio dissolvido no meio usou-se uma sonda de oxigénio galvânica (*Biolafitte*).

O meio de cultura para os inóculos e fermentador já foi descrito acima, na secção A.1.1. A bactéria *Ps. stutzeri* ATCC 11607 foi mantida em rampas de meio Nutrient Agar (*Difco*). Para o pré-inóculo preparam-se dois balões Erlenmeyer de 500 ml com 150 ml de meio de cultura, que foram inoculados a partir das rampas. Foram incubados a 30°C durante cerca de 24 horas, numa incubadora orbital a 150 rpm (*Infors*). Para o inóculo prepararam-se 2 balões Erlenmeyer de 5 l com 1.5 l de meio de cultura. Cada um destes balões foi inoculado por adição de 150 ml de pré-inóculo, e incubado nas mesmas condições durante cerca de 24 horas.

O reactor, por sua vez foi inoculado com o volume dos balões do inóculo (3 l). As células foram recolhidas no início da fase estacionária, antes que o nível de oxigénio dissolvido no meio subisse para valores detectáveis pelo medidor de oxigénio.

## A.2. Crescimento da Bactéria *Pseudomonas náutica* 617 e Obtenção das Membranas Celulares

A bactéria *Ps. nautica* 617 (Colecção do Instituto Pasteur, referência *Ps. nautica* no. 617/1.85) foi crescida em condições desnitrificantes, a 30°C em reactores de 200 litros, com 10 mM de nitrato como aceitador electrónico. A composição do meio de cultura encontra-se na tabela A.7.

**Tabela A.7.** Composição do meio de cultura para o crescimento da bactéria *Ps. nautica* 617

Reagente	Quantidade para 1 litro de meio
NaCl	11.7 g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	12.3 g
KCl	0.75 g
Tris	6.05 g
NH <sub>4</sub> Cl	3 g
CaCl <sub>2</sub>	1.49 g
Extracto de Levedura	1 g
Lactato	10 g

Após preparação do meio, o pH foi ajustado a 7.5 com 10 M HCl, esterilizado e suplementado com a solução de oligoelementos anteriormente apresentada na tabela A.3 e com as soluções de  $\text{FeSO}_4$  e  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  nas proporções indicadas na tabela A8.

**Tabela A.8.** Soluções para suplementar o meio de cultura para o crescimento de *Ps. nautica*

Solução	Para 1 litro de meio de cultura
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (1 mg /ml) <sup>2</sup>	2 ml
$\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (1.86 % (p/v))	4 ml
Oligoelementos (tabela A.3)	0.2 ml

As células foram recolhidas por centrifugação, no final da fase estacionária. O rendimento em peso húmido foi de cerca de 1g de células por litro de meio de cultura.

As células foram ressuspensas em tampão 100 mM Tris-HCl pH=7 e partidas numa *French Press*. O extracto foi centrifugado a 8 000×g durante 20 minutos para separar as células inteiras e só então ultracentrifugado duas vezes a 125 000×g durante 1 hora para separar as membranas celulares do extracto solúvel. As membranas foram guardadas a -70°C.

<sup>2</sup> Adicionar 2 a 3 gotas de ácido sulfúrico a esta solução.

### **A.3. Bibliografia**

1. **Starkey, R. L.** (1938) "A Study of spore formation and other morphological characteristics of *Vibrio desulfuricans*." *Arch. Microbiol* **8**, 238-304

## *APÊNDICE B*

---

---

### Materiais e Métodos Gerais

---

---

## Apêndice B – Materiais e Métodos Gerais

B.1. Preparação de Esferoplastos a partir de Células de <i>Ps. stutzeri</i> ATCC 11607.....	239
B.2. Electroforese em Gel de Poliacrilamida Desnaturante .....	240
B.2.1. Coloração de Géis para Detecção de Hemos.....	240
B.3. Electroforese de Proteínas Membranares .....	241
B.4. Espectroscopia de Emissão Atômica por Plasma Induzido.....	243
B.5. Determinação do Conteúdo em Ferro Hémico. Método da Piridina Hemocromogéneo.....	244
B.5.1. Amostras Contendo Apenas Hemos <i>c</i> .....	244
B.5.2. Determinação Simultânea do Conteúdo em Hemos <i>b</i> e <i>c</i> .....	245
B.6. Determinação do Conteúdo em Ferro Não Hémico. Método do TPTZ. ....	247
B.7. Determinação da Proteína. Método do BCA.....	249
B.7.1. Método Geral .....	249
B.7.2. Determinações de Proteínas Membranares .....	251
B.8. Determinação da Massa Molecular .....	253
B.8.1. Espectrometria de Massa .....	253
B.8.2. Cromatografia de Exclusão Molecular.....	253
B.8.3. Ultracentrifugação.....	254
B.9. Métodos Espectroscópicos .....	254
B.9.1. Espectrofotómetro de UV-Visível .....	254
B.9.2. Espectrómetro de RPE.....	255
B.10. Bibliografia .....	256



## B.1. Preparação de Esferoplastos a partir de Células de *Ps. stutzeri* ATCC 11607

A parede de peptidoglicano que envolve as células bacterianas pode ser destruída por ação da lisozima, uma enzima presente na saliva, lágrimas e clara do ovo. A lisozima hidroliza o peptidoglicano quebrando as ligações glicosídicas, o que enfraquece a parede celular. Desta forma, a água entra na célula, provocando um aumento de volume que eventualmente dará origem à lise celular. No entanto, se o meio exterior apresentar uma concentração elevada de um soluto que não consiga penetrar a célula (de forma a contrabalançar as concentrações intracelulares de solutos), como é o caso da sacarose, a lise celular não ocorre e formam-se **esferoplastos** [1]. Estes são estruturas esféricas envolvidas pela membrana celular, sem parede membranar e sem periplasma, o qual foi libertado para o meio.

Para destruir a parede de peptidoglicano, adiciona-se além da lisozima, EDTA, um agente quelante que se liga aos iões de cálcio e magnésio, presentes na parede celular como forma de estabilização.

**Tabela B.1.** Soluções para a formação de Esferoplastos

Solução	Quantidade para 100 g de células
Tampão 10 mM Fosfato de sódio pH=7	100 ml
1 M Sacarose	500 ml
Tampão 1M Tris-HCl pH=8	40 ml
0.1 M EDTA pH=7	40 ml
Lisozima (4 mg/ml)	120 ml
0.1 M MgCl <sub>2</sub>	100 ml

O procedimento experimental para a formação de esferoplastos a partir de 100 gramas de células de *Ps. stutzeri* ATCC 11607 é o seguinte [2, 3]:

1. Ressuspender as células no mesmo volume de Tampão 10 mM fosfato, pH=7. Usar um homogeneizador (*Potter*).

2. Misturar as soluções de sacarose, Tris-HCl, EDTA e lisozima nas quantidades indicadas na tabela B.1. Adicionar as células a esta mistura num fio contínuo, sob agitação.
3. Após 2 minutos de incubação adicionar 100 ml de MgCl<sub>2</sub>. Incubar a 30°C durante 30 minutos
4. Se a mistura estiver muito viscosa adicionar 45 mg de DNase e homogeneizar novamente com o *Potter*.
5. Centrifugar a 15 000×g, durante 30 minutos, a 4°C.

## B.2. Electroforese em Gel de Poliacrilamida Desnaturante

A electroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE) é usada como forma de verificar quais as proteínas presentes em cada fracção ao longo da purificação, bem como o grau de pureza de uma amostra ou a sua composição em subunidades. Esta técnica foi realizada de acordo com o método de Laemmli [4] modificado [5].

Os géis foram corados de duas formas diferentes:

- Com azul brilhante de *Coomassie* R-250 (2.0 g/l em 45% de metanol e 10% de ácido acético) para detectar todas as proteínas presentes.
- Com o método de Goodhew *et al.* [6] para detectar selectivamente apenas as bandas contendo hemoss.

### B.2.1. Coloração de Géis para Detecção de Hemoss

O método de coloração para géis descrito por Goodhew *et al.* [6] tira partido da actividade peroxidática inerente a todos os hemoss. No entanto, é selectivo para subunidades proteicas contendo hemoss do tipo *c*, pois estes são os únicos que continuam associados à proteína durante a electroforese em condições desnaturantes. Para a obtenção de cor usa-se 2,4,6-tripiridil-s-triazina (TMBZ), reagente que ao ser oxidado pelo hemo durante a reacção peroxidática dá origem a um precipitado insolúvel de cor azul. O método usado encontra-se descrito abaixo e apresenta algumas alterações em relação ao original.

### Método para coloração de géis de poliacrilamida para detecção de hemoss:

As soluções a preparar encontram-se na tabela B.2.

1. Os géis são polimerizados da forma usual, mas devem ser deixados a repousar, de preferência uma noite. Nos géis corridos imediatamente após a polimerização, o desenvolvimento de cor é mais fraco.
2. As amostras são fervidas como habitualmente, mas o tampão usado para a sua preparação não deve conter agentes redutores como DTT ou  $\beta$ -mercaptoetanol. A adição destes agentes pode interferir na reacção levando a uma fraca coloração.
3. Finalizada a electroforese, deixar o gel na solução III, ao abrigo da luz e com agitação durante 30 minutos.
4. Adicionar 300  $\mu$ l de  $H_2O_2$  a 30%. Agitar durante 10 minutos.
5. Lavar duas vezes com a solução IV.

**Tabela B.2.** Soluções para o método de coloração de hemoss

Solução	Reagente	Preparação
I	4.17 mM TMBZ	30 mg TMBZ em 30 ml de Metanol. Preparar sempre esta solução de fresco. Manter o TMBZ ao abrigo da luz.
II	0.25 M Acetato de Sódio	17.01 g de $CH_3COONa \cdot 3H_2O$ em 500 ml de $H_2O$ . Acertar o pH para 5 com ácido acético.
III	Solução de coloração	Misturar 30 ml da solução I com 70 ml da solução II.
IV	Solução de lavagem	Misturar 70 ml da solução II com 30 ml de propanol

### **B.3. Electroforese de Proteínas Membranares**

Os géis de SDS-PAGE da NOR de *Ps. nautica*, realizados através do método de Laemmli modificado, apresentavam bandas bastante difusas e alargadas e uma separação não muito eficaz. Houve, assim, necessidade de recorrer a outro método, o sistema Tricina-SDS-PAGE, desenvolvido por Schagger e von Jagow [7]. Este método apresenta a vantagem de se obter o mesmo grau de separação que o método de Laemmli com menores concentrações de

acrilamida. No entanto, apenas deve ser usado para separar proteínas até um limite máximo de 100 kDa.

A técnica consiste numa adaptação do método de Laemmli [4] em que se usa Tricina em vez de Glicina no tampão de corrida e em que as amostras são incubadas a 40°C em vez de fervidas. Esta última modificação melhora consideravelmente a resolução das bandas. A incubação a temperaturas superiores a 50°C pode levar a agregação e perda completa de algumas proteínas membranares das amostras.

**Tabela B.3.** Soluções “stock” para a electroforese de proteínas membranares

Solução	Reagente	Quantidades	Observações
<b>I -</b> Acrilamida/Bisacrilamida (49.5% T, 3%C)	Acrilamida	48 g	
	Bisacrilamida	1.5g	
	H <sub>2</sub> O	até 100 ml	
<b>II -</b> Tampão do Gel	3 M Tris Base	36.34 g	Ajustar o pH para 8.45 com HCl
	0.3 % SDS	0.3 g	
	H <sub>2</sub> O	até 100 ml	
<b>III -</b> Persulfato de Amónia	10% Persulfato de Amónia	100 mg	Dividir em alíquotas de 1 ml e congelar
	H <sub>2</sub> O	até 10 ml	
<b>IV -</b> Tampão do Cátodo	1 M Tris Base	121.2 g	pH=8.45 sem ajustar Diluir 1:10 antes de usar
	1 M Tricina	179.2 g	
	1 % SDS	10 g	
	H <sub>2</sub> O	até 1000 ml	
<b>V -</b> Tampão do Ânodo	1 M Tris Base	121.2 g	Ajustar o pH para 8.9 com HCl Diluir 1:10 antes de usar
	H <sub>2</sub> O	até 1000 ml	
<b>VI -</b> Tampão para as Amostras	12 % SDS (p/v)	1.2 g	Usa-se para amostras de baixa densidade. Para amostras de alta densidade diluir para ¼. No caso de o gel ser corado para hemos usar água em vez que β- mercaptoetanol.
	6% (v/v)		
	β - Mercaptoetanol	600 µl	
	30 % (p/v) Glicerol	3 g	
	0.05 % Serva Blue G	5 mg	
	0.15 M Tris Base	1.5 ml de Tris-HCl 1M, pH=7	
	H <sub>2</sub> O	até 10 ml	

**Tabela B.4.** Volumes necessários à preparação de um gel de Tricina SDS-PAGE

Solução Stock	Gel de Separação (volumes)		Gel de Concentração (volumes) 4%
	10% T, 3% C <sup>1</sup>	16% T, 3% C <sup>1</sup>	
I	1 ml	1.67 ml	166 µl
II	1.67 ml	1.67 ml	500 µl
Glicerol	400 µl	400 µl	—
H <sub>2</sub> O	1.930 ml	1.260 ml	1.334 ml
III	25 µl	17 µl	15 µl
TEMED	2.5 µl	1.7 µl	1.5 µl

As soluções “stock” usadas são apresentadas na tabela B.3. e os volumes necessários à preparação de um gel de 7×10 cm, com 0.75 mm de espessura (tina da *Bio-Rad Mini-protean II*- Mini Gel), vêm na tabela B.4.

As amostras são preparadas por adição do tampão das amostras, de forma a que este represente ¼ do volume final, e incubadas durante 30 minutos a 40°C.

Depois de o gel se encontrar polimerizado, aplicam-se as amostras nos poços e corre-se o gel a corrente constante. A corrente aplicada inicialmente é de 35 mA durante 45 minutos, aumentando-se depois para 70 mA durante mais 45 minutos.

## B.4. Espectroscopia de Emissão Atômica por Plasma Induzido

Os conteúdos em cálcio e ferro foram determinados por espectroscopia de emissão atômica por plasma induzido, num aparelho Jobin-Yvon, modelo Ultima equipado também

---

<sup>1</sup> %T significa a percentagem total de acrilamida e bisacrilamida sendo obtida através da seguinte equação:  $\%T = \frac{a+b}{V} \times 100$ . % C significa a percentagem de bisacrilamida em relação ao total e é obtido através da seguinte equação:  $\%C = \frac{a}{a+b} \times 100$ . Sendo **a** a quantidade de acrilamida, **b** a quantidade de bisacrilamida e **V** o volume em ml

com um gerador RF de 40.68 MHz e um monocromador tipo Czerny-Turner de 1.00 m, no Laboratório de Análises do ReQuimte, Centro de Química Fina e Biotecnologia, FCT, UNL.

Prepararam-se diluições entre 0.01 ppm e 0.2 ppm a partir de uma solução padrão 100 ppm em cálcio e ferro (*Reagecon*).

A CCP foi diluída em 10 mM HEPES pH=7.5 para uma concentração de aproximadamente 0.45  $\mu$ M. A NOR foi diluída em tampão 100 mM KPi pH=7, 0.05% dodecilo de  $\alpha$ -D-maltose, 0.01% álcool 2-feniletílico para uma concentração final de aproximadamente 0.23  $\mu$ M. Para se obter a concentração exacta, fez-se um espectro de UV/visível da amostra diluída. O tampão de diluição foi usado como branco.

## **B.5. Determinação do Conteúdo em Ferro Hémico. Método da Piridina-Hemocromogéneo**

Hemocromo é definido como um complexo entre uma ferroporfirina e uma base nitrogenada. Se o ferro estiver na forma férrica, o composto denomina-se hemicromo. No entanto, por motivos de simplificação usar-se-à o termo hemocromo para denominar qualquer complexo hemo-base nitrogenada, sem contar com o estado de oxidação do ferro.

No método da piridina hemocromogéneo para determinação do conteúdo em hemos há a formação de um complexo entre duas moléculas de piridina e uma de ferro-porfirina. A formação deste complexo é favorecida pelo meio básico que desnatura a proteína e facilita o acesso da piridina ao hemo. As bandas  $\alpha$  destes complexos são estreitas e características de cada tipo de hemo, não dependendo da proteína [8].

### **B.5.1. Amostras Contendo Apenas Hemos c**

A determinação do conteúdo em hemos na CCP de *Ps. stutzeri* é um procedimento relativamente simples, visto que esta enzima apenas possui hemos do tipo *c*. Para tal, seguiu-se o método de piridina-hemocromogéneo [8].

O procedimento experimental para a determinação do conteúdo em hemos do tipo *c* foi o seguinte:

1. Preparar uma solução “stock” de NaOH com uma concentração de 2 M.

2. Adicionar a uma célula de UV/visível 37.5  $\mu\text{l}$  da solução de NaOH (concentração final de 0.075 M) e 25  $\mu\text{l}$  de piridina (concentração final de 25%). Misturar bem.
3. Adicionar a amostra a analisar para uma concentração final entre 1 e 2  $\mu\text{M}$ . Perfazer o volume para 1 ml com água destilada. Misturar bem.
4. Reduzir com ditionito de sódio (cerca de 3 mg), misturar bem e traçar o espectro de UV/visível.
5. Determinar o conteúdo em hemos com base no coeficiente de extinção molar de  $29.1 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$  por hemo.

### B.5.2. Determinação Simultânea do Conteúdo em Hemos *b* e *c*

Quando a amostra proteica contém mais do que um tipo de hemo o método anteriormente usado tem que ser alterado devido à dificuldade de analisar espectros com bandas sobrepostas. As bandas de absorção dos complexos piridina-hemocromo de citocromos *b* e *c* apresentam-se bastante mais sobrepostas do que as bandas de absorção destes citocromos isoladamente. Assim, é necessário separar previamente os hemos ou usar sistemas de equações para calcular a concentração de cada um desses componentes numa mistura. Berry e Trumpower [9] desenvolveram dois métodos para realizar essa mesma análise. No primeiro método, a absorvância da mistura é medida a um número de comprimentos de onda igual ao número de componentes a ser analisado e no segundo a um maior número de comprimentos de onda. Para tal, foram determinados os coeficientes de extinção molar de cada um dos hemos a diversos comprimentos de onda [9]. O método usado para a determinação do conteúdo em hemos *b* e *c* em amostras da NOR de *Ps. nautica* foi o segundo, uma vez que a redundância de informação que nele é usada permite analisar espectros que contenham contribuição de mais espécies para além das que se pretende quantificar. Este, baseia-se no ajuste dos valores experimentalmente obtidos para as absorvâncias, em relação aos valores esperados tendo em conta os componentes das amostras usadas, através do método dos mínimos quadrados. Para tal, são usadas matrizes de coeficientes de extinção molar para cada tipo de hemo a cada comprimento de onda.

O procedimento experimental é apresentado de seguida:

**Tabela B.5.** Soluções “stock” de Piridina/NaOH para a determinação simultânea da concentração em hemos *b* e *c*.

Reagente	Concentração Final na Solução “stock”	Quantidades para 5 ml
NaOH	200 mM	Adicionar 500µl de uma solução 2 M em NaOH
Piridina	40 %	Adicionar 2 ml de piridina concentrada
Ferricianeto de Potássio	0.6 mM	Adicionar 30 µl de uma solução 0.1 M $K_3Fe(CN)_6$

1. Preparar uma solução “stock” piridina/NaOH de acordo com a tabela B.5.
2. Adicionar à célula de UV/visível 0.5 ml da solução “stock” de piridina/NaOH e 0.5 ml de uma solução da proteína com uma concentração entre 2 e 4 µM. Misturar bem e traçar o espectro de UV/visível.
3. Reduzir a amostra anterior adicionando cerca de 4 mg de ditionito sólido. Misturar bem e traçar, de imediato, espectros sucessivos até que a absorvância da banda do soreset de aumentar. Usar o espectro que apresentar o valor máximo de absorvância na banda do soreset após redução.
4. Análise dos resultados:

As diferenças nas absorvâncias entre o espectro reduzido e oxidado, lidas aos comprimentos de onda indicados na tabela B.6.<sup>2</sup>, foram multiplicadas pelos valores apresentados na coluna de cada tipo de hemo, obtendo-se uma nova tabela. A concentração (em milimolar) de cada tipo de hemo presente na amostra analisada é dada pela soma da coluna respectiva, desta nova tabela. Finalmente divide-se a concentração obtida para cada tipo de hemo pela concentração da proteína na amostra, e obtém-se o número de hemos por proteína.

<sup>2</sup> A tabela B.6. vem da referência [9] e foi obtida através da inversa da matriz dos coeficientes de extinção molar de diferença entre a forma reduzida e a oxidada para cada tipo de hemo, aos comprimentos de onda seleccionados.



**Tabela B.6.** Valores a multiplicar pela absorvância a cada comprimento de onda de forma a quantificar hemos *c* e *b*.

Comprimento de onda (nm)	Matriz Hemo <i>c</i>	Matriz Hemo <i>b</i>
530	-0.00964	-0.00803
540	-0.00637	-0.01253
549	0.03411	-0.01179
553	0.01428	0.01236
558	-0.02526	0.03444
570	-0.01086	-0.00612
580	-0.00195	-0.00257
588	0.00344	0.00279
600	0.00312	-0.00187
610	0.00052	-0.00434
620	-0.00149	-0.00232

## B.6. Determinação do Conteúdo em Ferro Não Hémico. Método do TPTZ.

A concentração em ferro não hémico na NOR de *Ps. nautica* foi determinada através do método do TPTZ [10]. Neste método o ferro existente nas amostras é primeiramente extraído e a proteína precipitada e descartada. O ferro é então reduzido para reagir com o TPTZ. As soluções utilizadas para realizar esta determinação encontram-se na tabela B.7.

**Tabela B.7.** Soluções para a determinação da concentração de ferro não hémico pelo método do TPTZ.

Solução	Preparação
8M HCl	66.3 ml de HCl 37 % em 33.7 ml de H <sub>2</sub> O
80% TCA	40 g em 50 ml com H <sub>2</sub> O destilada
75% Acetato de amónia	37.5 g em 50 ml com H <sub>2</sub> O destilada
10% Cloreto de hidroxilamina	5 g em 50 ml com H <sub>2</sub> O destilada
4 mM TPTZ	64.4 mg em 50 ml de HCl 0.04 M

1. Preparar uma recta de calibração num volume total de 400 µl, com uma solução “stock” de padrão de Ferro, de acordo com a tabela B.8. Preparar cada padrão em duplicado, em tubos de 1.5 ml de microcentrífuga. Preparar as amostras também para um volume total de 400 µl.

$$[\text{Fe}]_{\text{padrão}} = 1035 \mu\text{g Fe/ml}$$

$$\text{Diluir o padrão 1:100 } ([\text{Fe}] = 0.1853 \text{ nmol}/\mu\text{l})$$

**Tabela B.8.** Preparação da recta de calibração para a determinação da concentração em ferro não hémico pelo método de TPTZ.

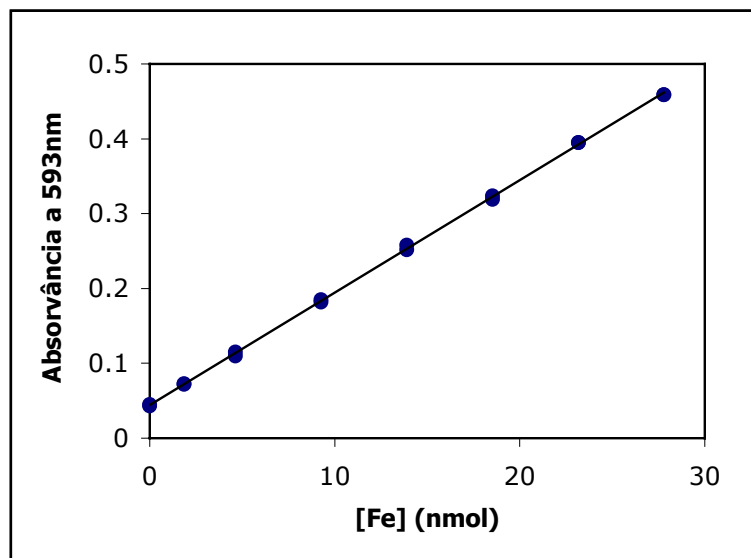
<b>Padrão</b>	<b>Volume padrão de Fe (µl)</b>	<b>Volume de água destilada a adicionar (µl)</b>	<b>[Fe] (nmol)</b>
P <sub>0</sub>	0	400	0
P <sub>1</sub>	10	390	1.85
P <sub>2</sub>	25	375	4.63
P <sub>3</sub>	50	350	9.27
P <sub>4</sub>	75	325	13.90
P <sub>5</sub>	100	300	18.53
P <sub>6</sub>	125	275	23.16
P <sub>7</sub>	150	250	27.80

2. Adicionar 50 µl da solução de ácido clorídrico para extrair o ferro. Agitar no *vórtex* e incubar 10 minutos à temperatura ambiente.

3. Adicionar 50 µl da solução de TCA para precipitar a proteína. Agitar no *vórtex* e centrifugar os tubos a 12 000 rpm durante cerca de 5 minutos. A proteína precipitada fica nos tubos velhos e os 400 µl de sobrenadante são transferidos para tubos novos.

4. Adicionar 100 µl de acetato de amónia e 40 µl da solução de TPTZ. Incubar 10 minutos à temperatura ambiente.

5. Ler a absorvância a 593 nm. Construir a recta de calibração através da representação gráfica da absorvância a 593 nm em função da concentração em ferro de cada padrão em nmol.



**Figura B.1.** Recta de calibração para a determinação da concentração em ferro não hémico pelo método de TPTZ.

## B.7. Determinação da Proteína. Método do BCA

### B.7.1. Método Geral

O método usado para a determinação da quantidade total de proteína numa amostra foi o método do BCA. Este método, desenvolvido por Smith *et al.* [11], baseia-se no método de Lowry [12], mas substitui o reagente de Folin-Ciocalteu pelo ácido bichiconínico (BCA). O ensaio torna-se assim, menos sensível aos componentes do tampão e detergentes. Uma outra vantagem deste método é o facto de se ter conseguido desenvolver um microensaio com 10 a 100 vezes melhor resolução do que o método de Lowry.

O princípio do método é a formação de um complexo  $\text{Cu}^{2+}$ -proteína em condições básicas, seguido da redução de  $\text{Cu}^{2+}$  a  $\text{Cu}^{+}$ . O grau de redução é proporcional à quantidade de proteína presente. A detecção é obtida através do complexo azul/púrpura formado pelo BCA com  $\text{Cu}^{+}$  em condições alcalinas.

O protocolo usado baseia-se no ensaio descrito pelo fabricante do Kit de BCA (*Sigma*), e encontra-se descrito abaixo.

Reagentes presentes no Kit (*Sigma*):

**Reagente A** – Solução de BCA, carbonato de sódio, tartarato de sódio e bicarbonato de sódio em 0.1M NaOH (pH=11.25)

**Reagente B** – 4 % de sulfato de cobre (II) pentahidratado

1. Preparar uma recta de calibração num volume total de 100 µl, com uma solução padrão de albumina de soro bovino (BSA) 2mg/ml, de acordo com a tabela B.9. Preparar cada padrão em duplicado, em tubos de microcentrífuga de 1.5 ml.

**Tabela B.9.** Preparação da recta de calibração para a determinação da quantidade total de proteína pelo método de BCA

<b>Padrão</b>	<b>Volume de BSA 2mg/ml (µl)</b>	<b>Volume de água destilada a adicionar (µl)</b>	<b>µg de proteína</b>
P <sub>0</sub>	0	100	0
P <sub>1</sub>	2	98	4
P <sub>2</sub>	4	96	8
P <sub>3</sub>	6	94	12
P <sub>4</sub>	8	92	16
P <sub>5</sub>	10	90	20
P <sub>6</sub>	12	88	24
P <sub>7</sub>	14	84	28

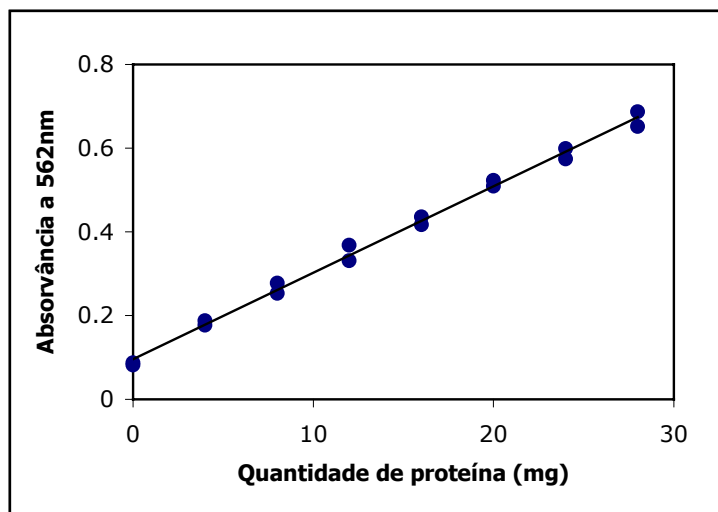
2. Preparar as amostras para um volume total de 100 µl de forma que a quantidade total de proteína esteja dentro dos limites da recta de calibração.

3. Preparar o reagente de BCA por adição de 49 ml do reagente A e 1 ml do reagente B.

4. Adicionar 1 ml do reagente BCA a cada tubo de padrão e amostra e agitar imediatamente no *vórtex*. Deixa-se incubar a 37°C durante 30 minutos.

5. Ler as absorvâncias a 562 nm.

6. A recta de calibração é construída representando graficamente a absorvância lida a 562 nm em função da quantidade de proteína padrão em microgramas. O gráfico resultante é apresentado na figura B.2.



**Figura B.2.** Recta de calibração para a determinação da quantidade de proteína pelo método de BCA.

### B.7.2. Determinações de Proteínas Membranares

Nas determinações com proteínas membranares, pode existir interferência do detergente em que se encontram as amostras. Assim, o método seguido foi ligeiramente diferente.

Os padrões para a recta de calibração, bem como as amostras, foram preparados no mesmo tampão (com detergente) em que estas se encontravam. Preparam-se amostras com diversos volumes do “stock” inicial de proteína.

Por fim representou-se graficamente a absorvância a 562 nm em função do volume de “stock” de proteína adicionado, tanto para as amostras como para os padrões. Esta representação encontra-se ilustrada na figura B.3.

As concentrações das amostras nos respectivos “stocks” foram determinadas através da equação (1), que se encontra deduzida abaixo:

$$Q = V \times C \quad \text{e} \quad A \propto Q \quad \text{logo} \quad A \propto V \times C,$$

ou seja  $A = a \times C \times V$

Neste caso temos uma representação da absorvância em função do volume, portanto:

$$A = m \times V$$

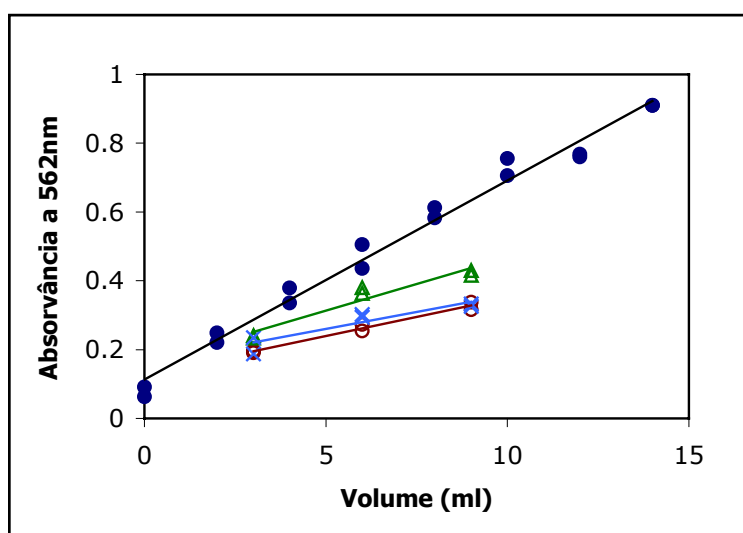
Então:

$$m \times V = a \times C \times V$$

$$\frac{m_A}{m_P} = \frac{a \times C_A}{a \times C_P} \quad \text{e por fim:}$$

$$C_A = C_P \times \frac{m_A}{m_P} \quad (1)$$

Em que: Q - quantidade de proteína, V - volume de "stock" de proteína adicionado, C - concentração no "stock" ( $C_A$  da amostra e  $C_P$  do "stock" do padrão de BSA), A - absorvância, m - declive da recta da absorvância em função do volume de "stock" ( $m_A$  para a amostra e  $m_P$  para a recta dos padrões), a - coeficiente de proporcionalidade mássico.



**Figura B.3.** Absorvância a 562 nm em função do volume dos padrões e amostras para a determinação da quantidade de proteína pelo método de BCA para proteínas membranares.

## B.8. Determinação da Massa Molecular

### B.8.1. Espectrometria de Massa

A espectrometria de massa (através do método de “electrospray”) da CCP foi levada a cabo pelo Dr. Bart Devreese, no laboratório de Bioquímica e Engenharia de Proteínas, Universidade Estatal de Gent, Bélgica. A espectrometria de massa da NOR foi levada a cabo pelo Dr. Juan J. Calvete, no Instituto de Biomedicina de Valência, Espanha.

### B.8.2. Cromatografia de Exclusão Molecular

Para a determinação da massa molecular aparente da CCP foram usadas duas colunas de exclusão molecular. A coluna Superdex 75, pré-empacotada (*Amersham Biosciences*, 1×30 cm), foi ligada a uma bomba de HPLC e operada a um fluxo de 0.5 ml/min com 10 mM Tris-HCl, pH=7.6, 150 mM NaCl. Para calibrar a coluna usaram-se os seguintes padrões de peso molecular: BSA (66 kDa), ovalbumina (45 kDa), anidrase carbónica (29 kDa), quimotripsina A (20.2 kDa), citocromo *c* de coração de cavalo (12.4 kDa) e aprotinina (6.5 kDa). A cada injeção, quer de padrão, quer de amostra, adicionou-se azul de dextrano. Esta substância apresenta o peso molecular acima do limite de exclusão da coluna, pelo que deverá sair no volume externo. Os coeficientes de retenção ( $R_f$ ) foram calculados através da razão entre o tempo de retenção da proteína e o tempo de retenção do azul dextrano. A massa molecular aparente das amostras foi calculada a partir do gráfico do logaritmo do peso molecular em função do coeficiente de retenção.

A coluna Sephadex G150-50 (*Amersham Biosciences*, 2.2×84 cm) foi operada por gravidade com um gradiente isocrático de 20 mM Tris-HCl, pH=8, 100 mM NaCl. Para calibração, os seguintes padrões de peso molecular foram usados: BSA (66 kDa), ovalbumina (45 kDa), anidrase carbónica (29 kDa) e mioglobina (17 kDa). A massa molecular aparente das amostras foi calculada a partir do gráfico do logaritmo do peso molecular em função do volume de eluição.

### B.8.3. Ultracentrifugação

Os ensaios de velocidade de sedimentação foram realizados numa ultracentrífuga analítica Óptima XL-A (*Beckman*), com um sistema de medição de absorção óptica acoplado, no Centro de Hidrodinâmica Macromolecular, Universidade de Nottingham, Reino Unido.

As amostras, com um volume de 400  $\mu\text{L}$ , foram colocadas, juntamente com o solvente nos canais respectivos, em células de ultracentrífuga de 12 mm de percurso óptico e centrifugadas a uma velocidade de 45 000 rpm. A alteração da posição da interface foi seguida ao comprimento de onda de 440 nm. Os dados foram recolhidos através do uso do software fornecido pelo fabricante (Microcal Origin v. 4.1) e analisados com o software DCDT+ desenvolvido por Philo [13]. Este software ajusta os resultados a uma distribuição gaussiana -  $g(s^*)$  em função de  $s^*$ . Os resultados são expressos em coeficientes de sedimentação ( $s_{20,w}$ ) corrigidos para as condições padrão (água como solvente e temperatura de 20°C).

As amostras de CCP, com uma concentração de 10  $\mu\text{M}$ , foram preparadas em tampão 10 mM HEPES, pH=7.5. A uma das amostras adicionou-se  $\text{CaCl}_2$  para uma concentração final de 2 mM. A outra adicionou-se EGTA de forma a obter uma concentração final de 1 mM.

## B.9. Métodos Espectroscópicos

### B.9.1. Espectrofotómetro de UV-Visível

Os espectros de UV/visível foram adquiridos num espectrofotómetro Shimadzu UV-265 de feixe duplo, ligado a um computador do tipo PC. A sua digitalização foi conseguida através do uso do programa PC-265 (versão 3.1).

As amostras de CCP para análise pela aplicação da espectroscopia de UV/visível preparadas em tampão 10 mM HEPES pH=7.5, apresentavam uma concentração de aproximadamente 4  $\mu\text{M}$ . A forma semi-reduzida foi obtida por adição de 1 mM de ascorbato de sódio e 10  $\mu\text{M}$  de DAD à célula de UV/visível. Para as amostras incubadas com cálcio, adicionou-se 2 mM  $\text{CaCl}_2$ . A CCP tratada com EGTA foi obtida por adição deste reagente, para uma concentração final na amostra de 1 mM, e incubação durante 30 minutos.

As amostras de NOR para os estudos espectroscópicos de UV/visível, preparadas em tampão 100 mM KPi pH=7.0, 0.02% dodecilo de  $\alpha$ -D-maltose, apresentavam uma



concentração de aproximadamente 4  $\mu\text{M}$ . A forma reduzida foi obtida por adição de 1 mM ditionito de sódio à célula de UV/visível.

### B.9.2. Espectrómetro de RPE

Os espectros de RPE a baixa temperatura foram adquiridos num espectrómetro de banda X, Bruker EMX, equipado com criostato de fluxo contínuo de hélio (*Oxford Instruments*). O software usado na aquisição e tratamento de dados foi o WINEPR (*Bruker*).

A concentração das amostra de CCP foi de aproximadamente 200  $\mu\text{M}$ . A amostra semi-reduzida foi obtida por adição de ascorbato de sódio (concentração final na amostra 1 mM) e DAD (concentração final na amostra 10  $\mu\text{M}$ ), sob corrente de árgon. As amostras foram incubadas durante 20 minutos e congeladas em azoto líquido, sempre sob corrente de árgon. As amostras com cálcio foram preparadas por adição de  $\text{CaCl}_2$  (2 mM) e incubação sob árgon durante 20 minutos.

A concentração das amostras de NOR variou entre 190 e 200  $\mu\text{M}$ . A amostra reduzida foi obtida por adição de uma solução de ditionito de sódio (4 mM) e incubação durante 20 minutos sob corrente de árgon. A amostra incubada com NO foi deixada durante 40 minutos sob fluxo de uma mistura de 5% NO/95% He. A produção de NO *in situ*, no tubo de EPR, foi conseguida por adição de nitrito de sódio à amostra anterior, sob corrente de árgon. Adicionou-se  $^{15}\text{NO}_2^-$  a algumas amostras com o intuito de obter uma forma da enzima ligada a  $^{15}\text{NO}$ . As quantificações de spins foram efectuadas em relação a uma amostra de CuEDTA (3.076 mM) nas mesmas condições das amostras. A quantificação do sinal correspondente ao hemo *c* foi realizada tendo em conta as aproximação de Aasa e Vangard [14] e De Vries e Albracht [15].

A simulação dos espectros de RPE foi realizada no programa SimFonia (*Bruker*).

## B.10. Bibliografia

1. **Brock, T. D., Madigan, M. T., Martinko, J. M. e Parker, J.** (1994) "*Biology of Microorganisms*". New Jersey, Prentice-Hall, Inc.
2. **Hunter, D. J., Brown, K. R. e Pettigrew, G. W.** (1989) "The role of cytochrome *c4* in bacterial respiration. Cellular location and selective removal from membranes." *Biochem J* **262**, 233-240
3. **Goodhew, C. F., Wilson, I. B., Hunter, D. J. e Pettigrew, G. W.** (1990) "The cellular location and specificity of bacterial cytochrome *c* peroxidases." *Biochem J* **271**, 707-712
4. **Laemmli, U. K.** (1970) "Cleavage of structural proteins during the assembly of the of bacteriophage T4." *Nature* **227**, 680-685
5. **Hanes, B. D. e Rickwood, D.** (1994) "*Gel Electrophoresis of Proteins - A Practical Approach*", IRL Press
6. **Goodhew, C. F., Brown, K. R. e Pettigrew, G.** (1986) "Haem staining in gels, a useful tool in the study of bacterial *c*-type cytochromes." *Biochim Biophys Acta* **852**, 288-294
7. **Schagger, H. e von Jagow, G.** (1987) "Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa." *Anal Biochem* **166**, 368-379
8. **Fuhrhop, J. H.** (1975) "Laboratory Methods." In *Porphyrins and Metalloporphyrins*, ed. Smith, K. M., pp. 757-862. The Netherlands, Elsevier Scientific Publishing Company
9. **Berry, E. A. e Trumpower, B. L.** (1987) "Simultaneous determination of hemes *a*, *b*, and *c* from pyridine hemochrome spectra." *Anal Biochem* **161**, 1-15
10. **Fischer, D. S. e Price, D. C.** (1964) "A Simple Serum Iron Method Using the New Sensitive Chromogen Tripyridyl-S-Triazine." *Clin Chem* **10**, 21-31
11. **Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J. e Klent, D. C.** (1985) "Measurement of Protein using bicinchoninic acid." *Anal Biochem* **150**, 76-85
12. **Lowry, Y. e Racker, E.** (1971) "Protein measurement with the folin phenol reagent." *J Biol Chem* **246**, 5477-5487

13. **Philo, J. S.** (2001) "A method for directly fitting the time derivative of sedimentation velocity data on an alternative algorithm for calculating sedimentation coefficient distribution functions." *Anal Biochem* **279**, 151-163
14. **Aasa, R. e Vanngard, T.** (1975) "EPR Signal Intensity and Powder Shapes: A Reexamination." *Journal of Magnetic Resonance* **19**, 308-315
15. **De Vries, S. e Albracht, S. P. J.** (1979) "Intensity of Highly Anisotropic Low-Spin Heme EPR Signals." *Biochim Biophys Acta* **546**, 334-340



## *APÊNDICE C*

---

---

### Protocolos de Biologia Molecular

---

---

## Apêndice C – Protocolos de Biologia Molecular

C.1. Isolamento de ADN Genómico.....	261
C.2. Reacção de PCR.....	262
C.3. Quantificação de ADN.....	262
C.4. Electroforese em Gel de Agarose.....	263
C.5. Purificação de um Fragmento de ADN a Partir de um Gel de Agarose.....	264
C.6. Ligação ao Vector pGEM-T Easy e Transformação em Células Competentes.....	264
C.7. Isolamento de ADN Plasmídico .....	265
C.8. Reacções de Sequenciação .....	268
C.9. “Genome Walking” .....	268
C.9.1. Construção de Livrarias Genómicas .....	268
C.10. Bibliografia.....	270

## C.1. Isolamento de ADN Genómico

Para o isolamento de ADN genómico as bactérias são crescidas em meio líquido durante cerca de 16 horas. A bactéria *Ps. stutzeri* foi crescida no meio de cultura descrito no Apêndice A. Para o crescimento de *Ps. nautica* o meio indicado no Apêndice A sofreu apenas a alteração de não levar 10 mM nitrato, uma vez que se pretendia um crescimento aeróbio. Ambas foram incubadas a 30°C numa incubadora orbital com uma agitação de 220 rpm.

Para isolar o ADN de cada uma das bactérias foi seguido o protocolo do CTAB (brometo de cetiltrimetilamónia). Neste método procede-se a uma lise das bactérias, seguida da remoção das proteínas por digestão com a enzima proteolítica Proteinase K. Os restos celulares, polissacáridos, péptidos e proteínas residuais são removidos por precipitação com CTAB. O ADN é precipitado com isopropanol. O protocolo foi seguido na secção 2.4.1 do “*Current Protocols in Molecular Biology*” [1]

Após ressuspender o ADN da forma indicada no protocolo procedeu-se a uma **digestão com RNase** da forma abaixo indicada:

1. Adicionar 1 µl de uma solução 10 mg/ml de RNase.
2. Incubar a 37°C durante 2 horas.
3. Extrair o ARN e a RNase através dos seguintes passos:
  - 3.1. Adicionar 1 volume de uma mistura fenol/clorofórmio/álcool isoamílico na proporção 25:24:1. Agitar energicamente e centrifugar a 13 000 rpm durante 10 minutos.
  - 3.2. Retirar a fase aquosa (em cima) para um tubo limpo.
  - 3.3. Adicionar 1 volume de uma mistura clorofórmio/álcool isoamílico na proporção 24:1. Agitar energicamente e centrifugar a 13 000 rpm durante 10 minutos.
  - 3.4. Retirar a fase aquosa (em cima) para um tubo limpo. Adicionar 1/10 do volume de 3M NaCl e 2.5 volumes de 100% etanol frio (retirado do congelador).
  - 3.5. Nesta fase o ADN vai precipitar. Remover o ADN com uma pipeta Pasteur fechada à chama em forma de anzol. Transferir para uma solução de 70 % etanol a frio. Centrifugar a 13 000 rpm durante 10 minutos. Descartar o etanol e deixar secar o ADN.
4. Ressuspender o ADN em 50 µl de água esterilizada. Manter a 4°C.

## C.2. Reacção de PCR

A reacção da polimerase em cadeia (*Polimerase Chain Reaction* - PCR), foi usada para amplificação de zonas específicas do genoma, ou seja, a zona situada entre os dois iniciadores usados em cada caso.

Os componentes e respectivas concentrações usados nas reacções de PCR encontram-se descritos na tabela C.1.

**Tabela C.1.** Componentes e concentrações usados nas reacções de PCR. O volume total de cada reacção foi de 50  $\mu\text{l}$ .

Componente	Concentração na Reacção
ADN molde	1 ng/ $\mu\text{l}$
Tampão de PCR ( <i>Pharmacia</i> )	1 $\times^1$
dNTP's	0.2 mM
Iniciadores	1 pmol/ $\mu\text{l}$
<i>Taq</i> ADN Polimerase ( <i>Pharmacia</i> )	2.5 U <sup>2</sup>
H <sub>2</sub> O	Para perfazer 50 $\mu\text{l}$

## C.3. Quantificação de ADN

A quantificação do ADN foi realizada através de um espectro de absorção traçado na região do ultravioleta entre 220 nm e 350 nm. A 260 nm uma unidade de absorvância corresponde a uma concentração de 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (ou seja 0.15 mM) de ADN.

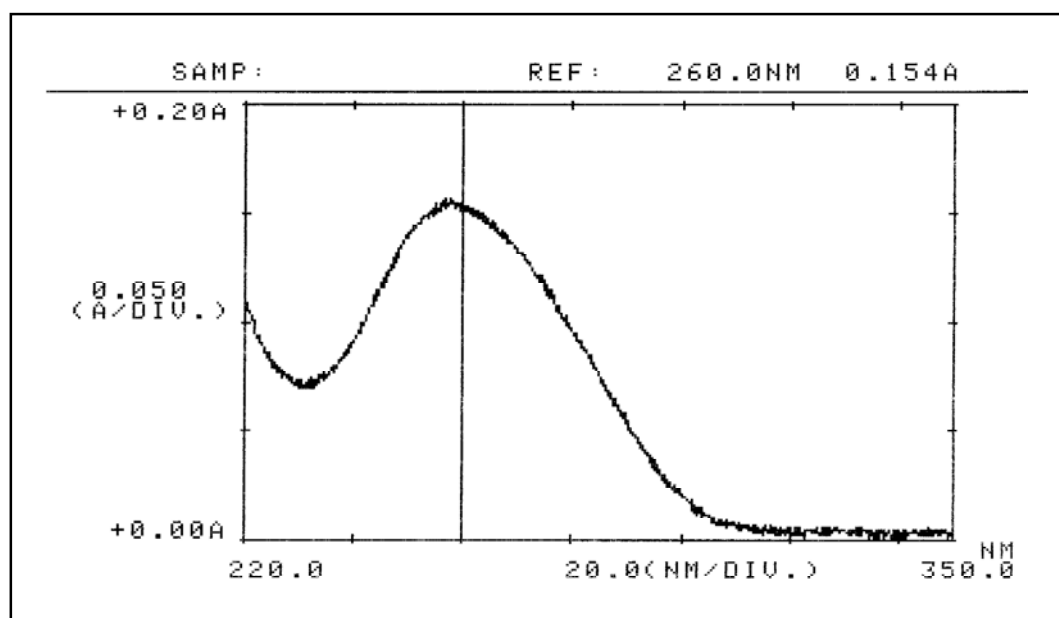
Na figura C.1. é apresentado um exemplo de um espectro traçado na região do ultravioleta de ADN.

---

<sup>1</sup> O tampão é específico da Polimerase e é fornecido pelo fabricante. A sua composição, na forma 10  $\times$  concentrado, é a seguinte: 500 mM KCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub> e 100 mM Tris-HCl (pH=9 à temperatura ambiente).

<sup>2</sup> Uma unidade da enzima é definida como a quantidade necessária à incorporação de 10 nmol de nucleótidos em 30 minutos a 70°C.





**Figura C.1.** Exemplo de um espectro de absorção de ultravioleta do ADN.

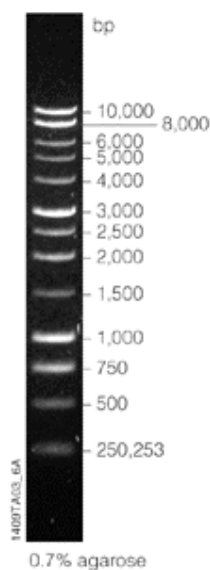
#### C.4. Electroforese em Gel de Agarose

A electroforese em gel de agarose permite separar os fragmentos de ADN de acordo com o seu tamanho, enquanto migram para o pólo positivo. Diferentes concentrações de agarose entre 0.5 e 1.5% (p/v) foram usadas consoante o tamanho dos fragmentos esperados. Géis com uma maior percentagem de agarose são indicados para a resolução de fragmentos mais pequenos.

Os géis de verificação de resultados foram corridos, geralmente, a 100 V com excepção dos géis usados para extracção de bandas específicas que foram corridos a 80 V para uma melhor resolução. O tampão usado para a preparação do gel e para a corrida foi Tris-Acetato (40 mM Tris base, 40 mM ácido acético, 1 mM EDTA) (TAE).

Para visualização das bandas de ADN, foi incluído no gel brometo de etídio com uma concentração de 0.1 µg/ml. Os fragmentos de ADN são visualizados por aplicação de luz ultravioleta.

A figura C.2. é um gel de 0.7% agarose do marcador de pesos moleculares “1kB DNA ladder” (Promega) usado para determinar o peso molecular aproximado dos fragmentos de ADN.



**Figura C.2.** Gel de 0.7% de agarose do marcador de pesos moleculares “1kB DNA ladder” (*Promega*) com o peso de cada banda indicado do lado direito.

## C.5. Purificação de um Fragmento de ADN a Partir de um Gel de Agarose

Para a extracção de ADN a partir de um gel de agarose, corta-se o fragmento de gel que contém a banda pretendida e purifica-se o ADN com o auxílio do *kit* de purificação “QIAquick Gel Extraction Kit (QIGene)”. O protocolo seguido foi o de extracção do gel com o auxílio de uma microcentrífuga (*QIAquick Gel Extraction Kit Protocol*), fornecido pelo fabricante [2]. A pureza do ADN extraído é verificada por electroforese em gel de agarose.

## C.6. Ligação ao Vector pGEM-T Easy e Transformação em Células Competentes

Após isolamento do fragmento de ADN resultante da amplificação por PCR, este é ligado ao vector pGEM-T Easy (*Promega*).

Na tabela C.2. encontram-se os componentes e respectivas quantidades usadas nas reacções de ligação e bem como os controlos.

**Tabela C.2.** Reacção de ligação ao vector pGEM-T Easy.

Componente	Quantidades Adicionadas (µl)		
	Reacção de Ligação	Controlo Positivo	Controlo Negativo
Tampão da ligase 2× ( <i>Promega</i> )	5	5	5
Vector pGEM-T Easy (50 ng/µl) ( <i>Promega</i> )	1	1	1
Fragmento de ADN	5	—	—
ADN de controlo ( <i>Promega</i> )	—	2	—
Ligase do DNA T <sub>4</sub> (3 U/µl)	1	1	1
H <sub>2</sub> O esterilizada	—	3	5

Deixou-se a mistura reaccional a incubar a 4°C durante 16 horas. Esta foi usada para a transformação em células competentes *Epicurian Coli* XL1-Blue (*Stratagene*). Seguiu-se o protocolo fornecido pelo fabricante [3].

### C.7. Isolamento de ADN Plasmídico

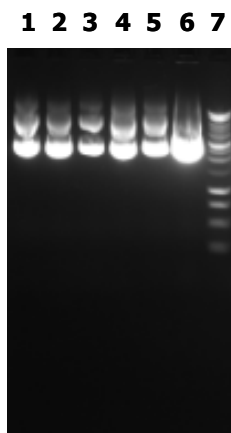
O protocolo seguido para o isolamento de ADN plasmídico encontra-se descrito abaixo (as soluções usadas encontram-se na tabela C.3):

**Tabela C.3.** Soluções e meios usados no isolamento de ADN plasmídico.

Solução	Composição
Meio Luria Broth	5 g de NaCl, 10 g de triptona, 5 g de extracto de levedura. H <sub>2</sub> O para 1 litro e autoclavar.
Tampão de lise	50 mM Glucose 25mM Tris-HCl pH=8 10 mM EDTA
Solução alcalina	Preparar a partir dos “stocks” 2 M NaOH e 10% SDS (p/v), com a seguinte ordem: adicionar 8 volumes de H <sub>2</sub> O esterilizada e 1 volume de NaOH. Misturar e adicionar 1 volume de SDS.
Acetato de amónia	7.5 M. pH 7.8 sem ajuste

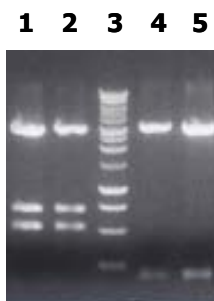
1. As colónias que adquiriram o plasmídeo recombinante são seleccionadas pela sua cor branca em meio Luria Broth (LB) sólido contendo ampicilina (100 µg/ml), IPTG (0.5 mM) e X-Gal (80 µg/ml), e crescidas em 6 ml de meio LB líquido com ampicilina (100 µg/ml) a 37°C, durante cerca de 16 horas.
2. Recolher as células através de uma centrifugação a 13 000 rpm, durante 3 minutos, em tubos de 1.5 ml. Descartar o sobrenadante através de aspiração. Repetir os passos anteriores até que toda a cultura celular tenha sido centrifugada.
3. Ressuspender as células em 200 µl de tampão de lise. Incubar à temperatura ambiente durante 5 min.
4. Adicionar 400 µl de uma solução alcalina preparada de fresco 0.2 M em NaOH e 1% em SDS, e misturar por inversão 6 ou mais vezes. A suspensão deve ficar transparente e viscosa. Incubar no gelo durante 5 min.
5. Adicionar 300 µl de uma solução 7.5 M acetato de amónia e misturar gentilmente durante alguns segundos. Incubar no gelo entre 30 minutos e 2 horas para permitir a precipitação das proteínas, ARN de elevado peso molecular e ADN cromossómico.
6. Centrifugar durante 5 minutos a 13 000 rpm. Remover o sobrenadante transparente, transferindo-o para um novo tubo de 1.5 ml. Repetir este passo até não se ver nenhum precipitado após a centrifugação.
7. Adicionar 2 µl de uma solução 10 mg/ml de RNase A (*Sigma*). Misturar e incubar a 37 °C durante 1 hora.
8. Adicionar 0.6 volumes de isopropanol (400 a 500 µl) e incubar à temperatura ambiente durante exactamente 10 minutos.
9. Centrifugar a 13 000 rpm durante 10 min.
10. Descartar o sobrenadante e adicionar 500 µl de 70% etanol (vindo do congelador) para lavar o precipitado, e centrifugar 3 minutos a 13 000 rpm. Descartar o sobrenadante.
11. Deixar os tubos invertidos sobre papel absorvente e usar uma ponta com um pouco de papel enrolado para secar a boca do tubo. Ter o cuidado de não tocar no precipitado.
12. Dissolver o ADN em 23 µl de H<sub>2</sub>O esterilizada por filtração.
13. Correr um gel de agarose de 1% com 2 µl deste ADN para verificar o resultado da extracção.

A figura C.3. apresenta um exemplo de um gel de verificação de uma extracção de ADN plasmídico. Em cada poço, várias bandas podem ser observadas, as quais correspondem às diferentes estruturas do ADN circular.



**Figura C.3.** Gel de 1% de agarose para verificação do resultado da extracção de ADN plasmídico. **Poços: 1 a 6** ADN plasmídico, **7.** Marcador de pesos moleculares 1kB (*Promega*)

Após verificar no gel a ausência de ARN e ADN cromossómico, faz-se uma digestão com a enzima de restrição *EcoRI* para verificar a presença do fragmento no vector. A figura C.4. apresenta um exemplo de um gel de uma digestão com *EcoRI* (*Stratagene*) de ADN plasmídico de duas transformações distintas.



**Figura C.4.** Gel de 1% de agarose da digestão de ADN plasmídico com *EcoRI* (*Stratagene*) para verificar a presença do fragmento inserido. **Poços: 1. e 2.** ADN plasmídico com que continha inserido um fragmento de cerca de 1200 pb (neste caso a enzima também cortou no meio interior do fragmento) **3.** Marcador de pesos moleculares 1kB (*Promega*) **3 e 4** ADN que continha inserido um fragmento de cerca de 150 pb..

## C.8. Reacções de Sequenciação

Para as reacções de sequenciação (num sequenciador automático *Amersham Biosciences-ALF Express II*) foram usados iniciadores específicos para a zona dos promotores T7 e SP6, para sequenciar no sentido 5'→3' e 3'→5', respectivamente, em relação ao fragmento inserido no vector. Usou-se o kit "*Thermo Sequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing kit with 7-deaza-dGTP*" (*Amersham Biosciences*) e seguiu-se o protocolo indicado pelo fabricante [4].

O programa de PCR foi o seguinte:

**Passo 1** – Desnaturação inicial da cadeia de ADN a 94°C, durante 3 minutos.

**Passo 2** – Desnaturação de cada ciclo a 94°C, durante 30 segundos.

**Passo 3** – Hibridação a 48°C<sup>3</sup>, durante 30 segundos.

**Passo 4** – Amplificação a 72°C durante 30 segundos.

(Os passos 2 a 4 foram repetidos 25 vezes)

**Passo 5** – Manutenção a 4°C em pausa.

## C.9. "Genome Walking"

A técnica de "*Gemone Walking*" foi utilizada para determinar as sequências das zonas a montante e a juzante de uma sequência de ADN conhecida. Foi utilizado o kit "*Universal Genomo Walker Kit*" (*Clontech*), tendo-se seguido o protocolo fornecido pelo fabricante [5].

### C.9.1. Construção de Livrarias Genómicas

Na técnica de "*Gemone Walking*", o primeiro passo é o isolamento do ADN genómico da bactéria e construção de livrarias genómicas por digestão do ADN com quatro enzimas de restrição diferentes e ligação de um adaptador fornecido no *kit* [5].

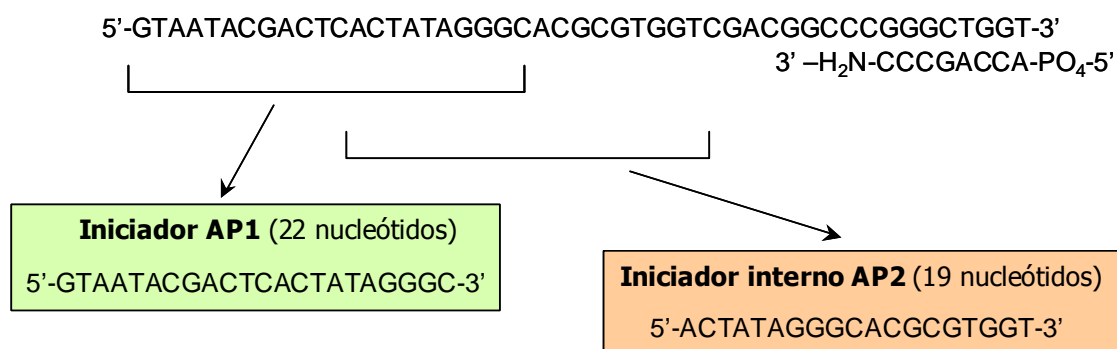
Na construção das livrarias genómicas o ADN foi digerido com as enzimas *DraI*, *EcoRV*, *PvuII* e *StuI*, fornecidas no *kit*. O adaptador foi ligado aos fragmentos resultantes de acordo com o protocolo. A sequência do adaptador, bem como dos iniciadores AP1 e AP2

---

<sup>3</sup> A temperatura de emparelhamento é escolhida tendo em conta a temperatura de fusão ( $T_m$ ) de cada um dos iniciadores. Neste caso  $T_m$  do PS1=57.5°C e do PS4=47.8°C.

usados na primeira e segunda reacções de PCR, respectivamente, encontram-se descritos abaixo:

Adaptador para o “Gemone Walking”:



A figura C.5. é um gel da digestão de ADN genómico de *Ps. stutzeri* com as diferentes enzimas de restrição usadas na construção das livrarias genómicas.



**Figura C.5.** Gel de 0.5% de agarose do ADN genómico da *Ps. stutzeri* ATCC 11607 digerido com diferentes enzimas de restrição. Poços: **1.** ADN não digerido, **2.** Marcador de pesos moleculares 1kB (*Promega*), **3.** ADN digerido com *DraI*, **4.** ADN digerido com *EcoRV*, **5.** ADN digerido com *PvuII*, **6.** ADN digerido com *StuI*, **7.** Controlo positivo (ADN genómico humano digerido com *PvuI*)

De seguida desenharam-se os iniciadores específicos para as zonas do ADN que se pretendiam amplificar e seguiu-se o protocolo do *kit* para a realização das reacções de PCR.

## C.10. Bibliografia

1. **Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Seidman, J. G., Smith, J. A. e Struhl, K.,** eds. (1989) "*Current protocols in molecular biology*". New York, Published by Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience : J. Wiley. 4 v. (loose leaf) pp.
2. "QIAquick Spin Handbook for: QIAquick PCR Purification Kit, QIAquick Nucleotide Removal Kit, QIAquick Gel Extraction Kit." (2000), *QIAGEN*
3. "Epicurian Coli XL1-Blue Subcloning-Grade Competent Cells and Epicurian Coli XL1-Blue Competent Cells: Instruction Manual." Stratagene
4. "Thermo sequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing kit with 7-deaza-dGTP." *Amersham Biosciences*
5. "Universal GenomeWalker Kit User Manual - PT3042-1(PR03300)." (2000), *Clontech*



## *APÊNDICE D*

---

---

### Ensaaios de Actividade

---

---

Apêndice D – Ensaio de Actividade

D.1. Ensaio de Actividade da Peroxidase do Citocromo <i>c</i> .....	273
D.2. Ensaio da Actividade da Redutase do Óxido Nítrico .....	275
D.2.1. Calibração do Eléctrodo.....	276
D.2.2. Preparação da Solução “Stock” de NO.....	279
D.2.3. Ensaio de Actividade .....	280
D.3. Bibliografia .....	282

## D.1. Ensaio de Actividade da Peroxidase do Citocromo c

O ensaio da actividade catalítica da CCP de *Ps. stutzeri* foi realizado de acordo com o método descrito por Gilmour *et al.* [1].

O ensaio foi realizado numa célula de espectroscopia de visível (vidro óptico) de 3 ml, com uma barra de agitação magnética. Monitorizou-se a diminuição de absorvância da banda  $\alpha$  do citocromo c, doador electrónico, à medida que este é oxidado pela CCP. Para tal, usou-se um espectrofotómetro Diode Array 8452A (*Hewlett Packard*) com agitação magnética movida pela passagem de água.

Dois citocromos foram usados como doadores electrónicos à CCP de *Ps. stutzeri*: o citocromo  $c_{551}$  isolado da mesma bactéria e o citocromo c mitocondrial de coração de cavalo (*Sigma*). O citocromo foi reduzido por adição de ascorbato de sódio (1 mM) e aplicado numa coluna Sephadex G-25 (PD 10, *Amersham Biosciences*) equilibrada com tampão 10 mM HEPES, pH=7.5, para retirar o excesso de redutor. Para a determinação da concentração de cada um dos citocromos usaram-se os seguintes valores de coeficientes de extinção molar:

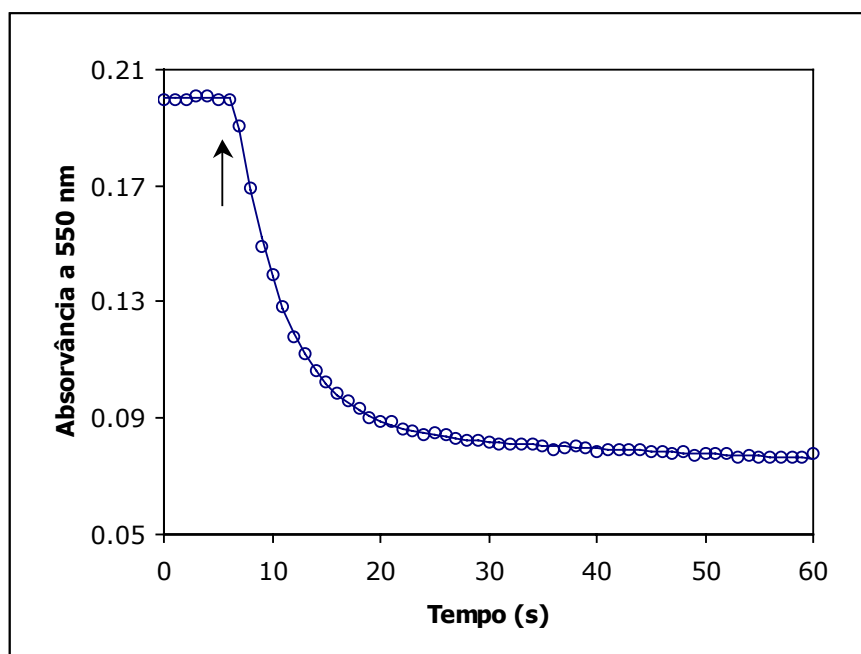
Citocromo  $c_{551}$  de *Ps. stutzeri* (reduzido) -  $\epsilon_{551\text{ nm}} = 30\,890\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$  [2]

Citocromo c de coração de cavalo (reduzido) -  $\epsilon_{550\text{ nm}} = 29\,000\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$

A CCP foi diluída em tampão 10 mM HEPES, pH=7.5, para uma concentração final de 4  $\mu\text{M}$  e incubada durante 30 minutos à temperatura ambiente (excepto nos ensaios para verificar o efeito do tempo de incubação na actividade). Quando era o caso, adicionou-se 1 mM cálcio e/ou 1 mM ascorbato e 10  $\mu\text{M}$  DAD a esta solução.

Para os ensaios pipetou-se para a célula de vidro o citocromo c reduzido (7  $\mu\text{M}$ ), NaCl (concentração dependente do ensaio) e 1 mM cálcio (quando era o caso), e tampão 10 mM HEPES pH=7.5 para um volume total de 3 ml. O  $\text{H}_2\text{O}_2$  (18  $\mu\text{M}$ ) foi adicionado apenas quando a mistura anterior já se encontrava sob agitação e sob monitorização a 550 nm<sup>1</sup>. A reacção foi sempre iniciada por adição da CCP (20 nM). Na figura D.1. encontra-se um exemplo de uma curva obtida para a absorvância a 550 nm em função do tempo

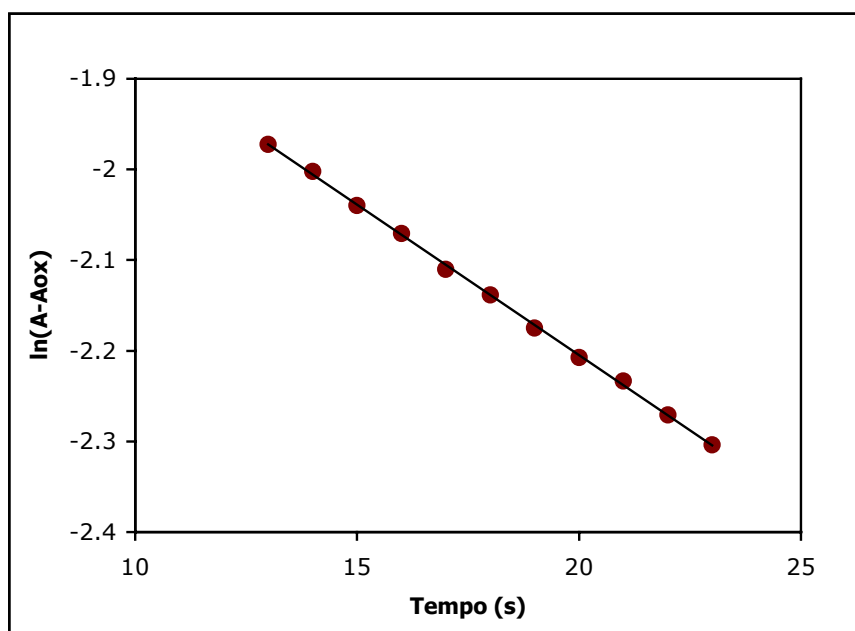
<sup>1</sup> Para verificar se o  $\text{H}_2\text{O}_2$  oxida o citocromo.



**Figura D.1.** Exemplo de uma curva da absorvância a 550 nm em função do tempo, obtida durante o ensaio de actividade da CCP de *Ps. stutzeri*. A seta indica o momento de adição da enzima à mistura reaccional.

A reacção seguiu uma cinética de pseudo-primeira ordem com ambos os citocromos. Nestas condições as velocidades iniciais ( $v_0$ ), podem ser calculadas pela determinação das constantes de velocidade ( $k$ ), em que  $v_0 = k[\text{Citocromo}]$ . A concentração do substrato,  $\text{H}_2\text{O}_2$ , é saturante.

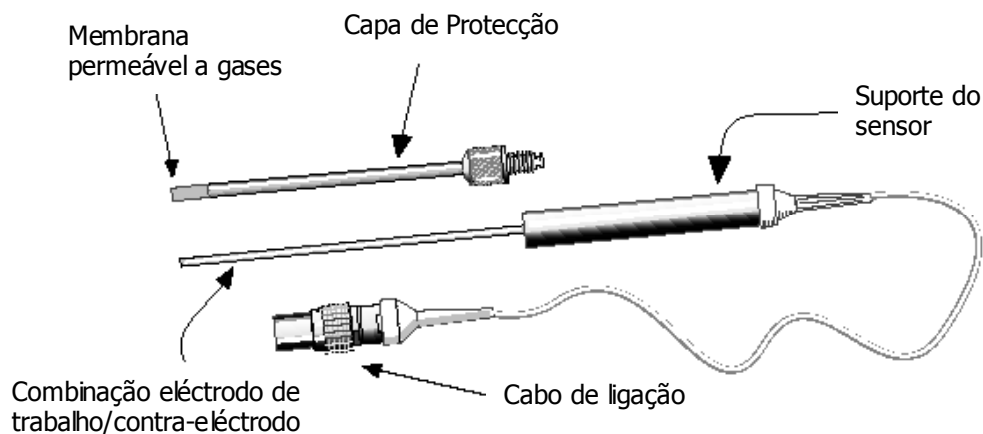
Para a determinação da constante de velocidade ( $k$ ), mediu-se o declive das linearizações do logaritmo da absorvância a 550 nm subtraída da absorvância do citocromo totalmente oxidado, em função do tempo (a figura D.2. é um exemplo de uma destas linearizações). Na maioria dos casos teve que se usar apenas os pontos referentes aos tempos iniciais da reacção, visto que os restantes fugiam já à linearidade. O declive ( $k$ ), foi então multiplicado pela concentração de citocromo de cada ensaio e dividido pela concentração de CCP, para dar a actividade do centro catalítico.



**Figura D.2.** Exemplo de uma linearização do logaritmo ( $\ln$ ) da absorvância a 550 nm ( $A$ ) subtraída da absorvância da mistura reaccional totalmente oxidada ( $A_{ox}$ ), em função do tempo, para determinação da actividade da CCP de *Ps. stutzeri*. Equação da recta:  $\ln(A-A_{ox}) = -0.0332 t - 1.5409$ .

## D.2. Ensaio da Actividade da Redutase do Óxido Nítrico

O ensaio de actividade da redutase do óxido nítrico foi realizado através da detecção do consumo de NO com um eléctrodo específico de NO, o "ISO-NO MarkII" (*World Precision Instruments*), com um sensor de 2 mm. Este eléctrodo apresenta elevada selectividade e sensibilidade para o NO. É um eléctrodo combinado, revestido por uma membrana, a qual faz com que apenas substâncias gasosas atinjam a sua superfície. A polarização do eléctrodo a 850 mV torna a sua sensibilidade para o  $N_2O$  (o produto da reacção da NOR) vinte e cinco vezes mais baixa do que para o NO. A figura D.3. apresenta um esquema do eléctrodo usado nos ensaios de actividade da NOR.



**Figura D.3.** Esquema do eléctrodo específico para NO ISO-NO (“World Precision Instruments”)

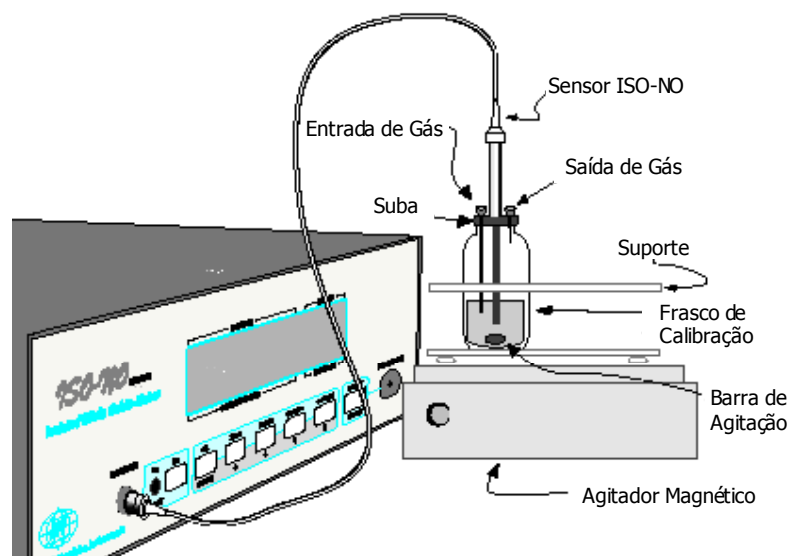
O NO difunde-se através da membrana e é oxidado à superfície do eléctrodo de trabalho, o que dá origem a uma corrente eléctrica. Esta é proporcional à concentração de NO presente na amostra.

### D.2.1. Calibração do Eléctrodo

As soluções usadas para a calibração encontram-se na tabela D.1. A figura D.4. é um esquema da montagem da calibração do eléctrodo específico para NO.

**Tabela D.1.** Soluções usadas na calibração do eléctrodo específico para NO

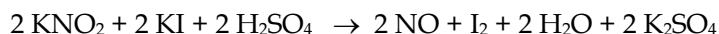
Solução	Preparação
Solução A - Padrão de nitrito de sódio (2.17 mM)	Diluir 1:10 a solução padrão de nitrito comercial (Merck) 21.7 mM
Solução B - Iodeto de potássio	Pesar 4.15 g de KI. Dissolver em H <sub>2</sub> O destilada. Adicionar 1.4 ml de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> a 97%. Perfazer o volume para 250 ml. Esta solução deve ser preparada de fresco e guardada ao abrigo da luz.



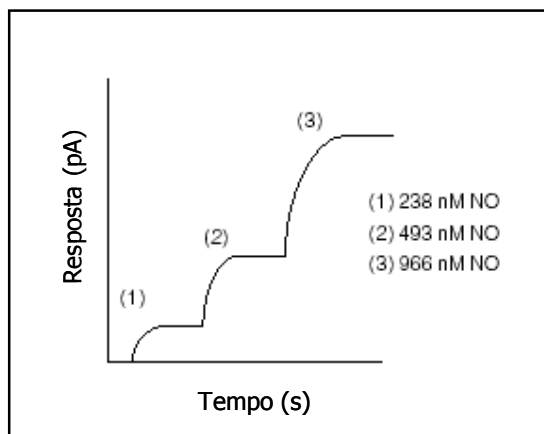
**Figura D.4.** Esquema da montagem usada na calibração do eléctrodo específico para NO.

O procedimento usado na calibração do eléctrodo foi o seguinte:

1. Introdz-se 10 ml da solução B no frasco de calibração, juntamente com a barra de agitação magnética.
2. Introdz-se o eléctrodo já ajustado no orifício da suba, na solução anterior, tendo o cuidado de nunca o deixar tocar no fundo do frasco.
3. Ligar o registador para que este comece a traçar a linha de base.
4. Fazer adições sucessivas da solução A e registar os incrementos de corrente causados pela produção do NO de acordo com a reacção abaixo indicada:



A figura D.5. é um exemplo de um registo de adições de diferentes quantidades de nitrito, com produção do mesmo número de moles de NO. A tabela D.2. apresenta as concentrações de NO formadas em cada adição e os respectivos aumentos de corrente provocados. A curva de calibração correspondente encontra-se na figura D.6.

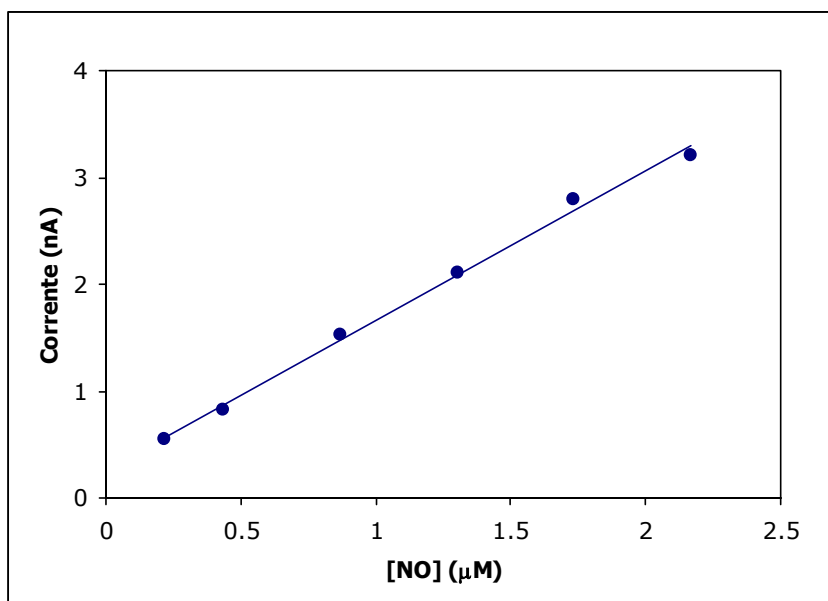


**Figura D.5.** Registo de uma calibração do eléctrodo de NO. A adição de diferentes quantidades de nitrito dá origem ao mesmo número de moles de NO. A resposta em termos de corrente é proporcional à concentração de NO no frasco de calibração.

**Tabela D.2.** Exemplo de uma calibração do eléctrodo de NO com a concentração de NO produzido e a resposta dada pelo eléctrodo.

[NO] ( $\mu\text{M}$ )	Resposta (nA)
0.217	0.55
0.434	0.83
0.868	1.53
1.302	2.1
1.736	2.8
2.170	3.2

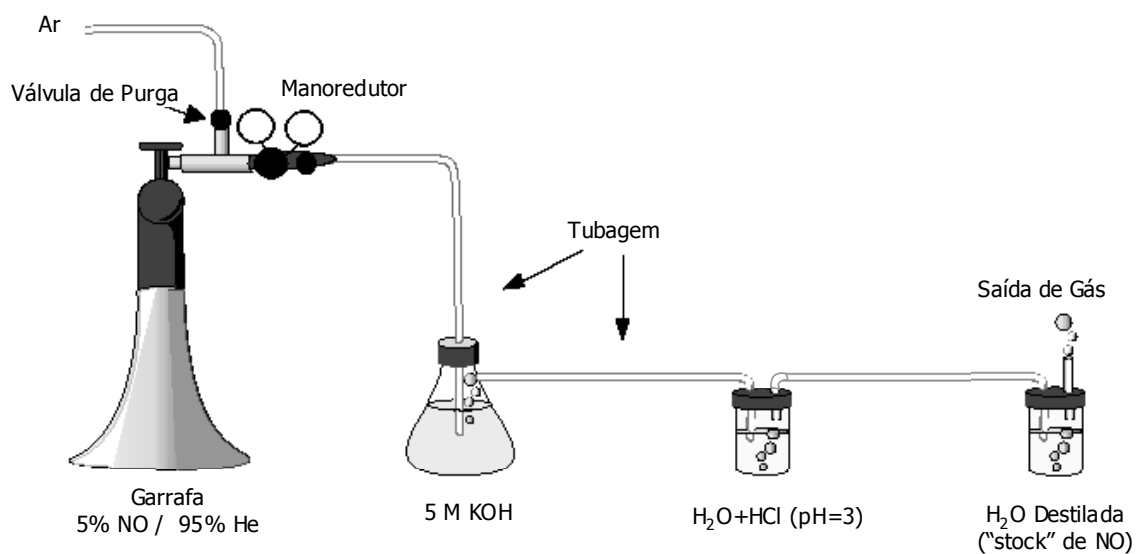




**Figura D.6.** Recta de calibração do electrodo específico para NO construída com os valores da tabela D.2. Equação da recta:  $\text{Corrente} = 1.399 [\text{NO}] + 0.2649$ .

### D.2.2. Preparação da Solução “Stock” de NO

O NO foi obtido a partir de uma mistura de 5%NO / 95% He (*Ar líquido*). A montagem realizada encontra-se esquematizada na figura D.7.

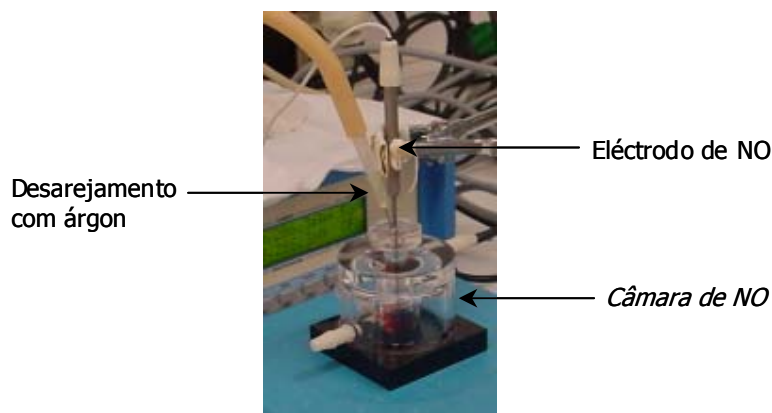


**Figura D.7.** Montagem para obtenção do “stock” de NO.

O gás à saída da garrafa é borbulhado numa solução de 5 M KOH para hidrolisar qualquer vestígio de  $N_2O$  que possa estar presente, passando depois por em água não tamponizada, cujo pH havia sido ajustado a 3 por adição de HCl, como forma de evitar a formação de  $NO_2^-$ . Finalmente o NO é borbulhado num último frasco com água até saturação. A 20°C a concentração de NO neste “stock” saturado é de 100  $\mu M$ .

### D.2.3. Ensaio de Actividade

O ensaio de actividade da NOR foi realizado numa Câmara para NO (“NO chamber”- *World Precision Instruments*). A figura D.8. é uma fotografia da montagem experimental. Os componentes da mistura reaccional e respectivas concentrações encontram-se na tabela D.3.



**Figura D.8.** Montagem para os ensaios de actividade da NOR.

**Tabela D.3.** Componentes usados na mistura reaccional do ensaio da redutase do óxido nítrico.

Componente	Concentração na solução stock	Quantidade Adicionada ( $\mu l$ )	Concentração no ensaio
Tampão KPi pH=6.0	20 mM	850	$\approx 17$ mM
Dodecilo de Maltose	10% (p/v)	2	0.02%
Citocromo c de cavalo	2 mM	10	20 $\mu M$
Metassulfato de fenazina (PMS)	5 mM	20	100 $\mu M$
Ascorbato de sódio	500 mM	20	10 mM
H <sub>2</sub> O saturada com NO	100 $\mu M$	[30-90]	[3-9] $\mu M$

O procedimento experimental foi baseado no ensaio descrito por Girsch *et al.* [3].

O oxigénio foi removido do tampão e da água usados nos ensaios através de ciclos de vácuo e argon.

O eléctrodo foi introduzido no orifício próprio na tampa ajustável em altura da câmara de NO. Esta foi colocada de modo a que o eléctrodo fique a alguns milímetros do fundo da câmara, sem nunca lhe tocar (isso poderia danificar a membrana). A câmara foi desarejada durante 4 minutos com argon através de um dos dois outros orifícios existentes na tampa destinados a adições. Passado este tempo, o tampão desarejado foi adicionado através de uma seringa *Hamilton* impermeável a gases (*gas tight*). De seguida adicionou-se o dodecilo de maltose, o citocromo *c*, o ascorbato de sódio e o PMS. Ligou-se o registador e adicionou-se a água saturada com NO. Após alguns segundos necessários para a verificação da diminuição não enzimática da concentração do NO, adicionou-se a enzima.

O declive de diminuição da intensidade de corrente em função do tempo foi convertido em concentração de NO por minuto através da equação da recta de calibração da figura D.6.

Os ensaios de actividade ao longo da purificação são normalizados por adição da mesma quantidade de proteína total à mistura reaccional. Assim a concentração de proteína total (determinada através do método de BCA) nos ensaios foi sempre de cerca de 5 mg/l.

### D.3. Bibliografia

1. **Gilmour, R., Goodhew, C. F., Pettigrew, G. W., Prazeres, S., Moura, J. J. G. e Moura, I.** (1994) "The kinetics of the oxidation of cytochrome c by *Paracoccus* cytochrome c peroxidase." *Biochem J* **300** ( Pt 3), 907-914
2. **Villalain, J., Moura, I., Liu, M. C., Payne, W. J., LeGall, J., Xavier, A. V. e Moura, J. J. G.** (1984) "NMR and electron-paramagnetic-resonance studies of a dihaem cytochrome from *Pseudomonas stutzeri* (ATCC 11607) (cytochrome c peroxidase)." *Eur J Biochem* **141**, 305-312
3. **Girsch, P. e de Vries, S.** (1997) "Purification and initial kinetic and spectroscopic characterization of NO reductase from *Paracoccus denitrificans*." *Biochim Biophys Acta* **1318**, 202-216